

ALINE CARBONERA LUVIZON

Modulação fenotípica induzida por guanosina em modelo de melanoma murino (B16F10)

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de concentração em Patologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

Co-orientador: Prof. Dra. Lia Sumie Nakao

CURITIBA
2008

À minha mãe, Rosa Maria.
Ao meu irmão, Diogo.
Ao meu noivo, Wanderley.
Pela compreensão nos momentos difíceis
e apoio incondicional. Por tudo que sou e
alcansei.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela proteção.

Aos meus pais, Rosa Maria e Osvaldo, pelo apoio, carinho e incentivo de sempre buscar mais conhecimento.

Aos meus irmãos, Diogo e Rafael, aos quais devo muito da formação do meu caráter.

Ao meu sobrinho, Miguel, o qual eu aprendi a amar desde quando fiquei sabendo da sua existência ainda na barriga da mãe e que trouxe a essa “tia coruja” muitos e muitos momentos de alegria.

Ao meu noivo, Wanderley, pelo amor, pela compreensão e principalmente pelo apoio nesta fase da minha vida.

Ao professor Sílvio Zanata, pela oportunidade de fazer parte dos alunos do seu laboratório, pela formação profissional e pessoal, por sua confiança, por sua amizade e sua preocupação.

À professora Lia Nakao, pela amizade, confiança e orientação minuciosa.

À professora Adriana Mercadante, pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Aos meus professores da graduação, alguns amigos, onde tudo começou...

Aos amigos e colegas que passaram pelo Laboratório de Neurobiologia Cecília, Tati, Daniel e Audrey, que seguiram seus rumos.

A todos os amigos e colegas que ainda estão no laboratório e que direta ou indiretamente ajudaram-me na realização deste projeto, mesmo esta ajuda sendo na manutenção de reagentes e da limpeza do ambiente, cujos nomes não citarei, pois encheria quase uma página.

Dentre esses amigos, agradecimento especial à Kátia, cuja ajuda foi essencial à execução deste trabalho.

À Michele, por todo conhecimento que me foi transmitido.

Aos amigos do Laboratório de Matriz Extracelular e Tecnologia de Venenos Kátia, Olga, Luíza, Dani, Youssef, Reginaldo, Valéria e Dilza, pela ajuda.

Aos professores do Departamento de Patologia Básica, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos amigos Thiago e Larissa, sempre presentes, apoiando-me e animando-me nos momentos mais difíceis.

À Capes e à Fundação Araucária, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

O melanoma cutâneo/metastático (MM) é um dos cânceres mais agressivos existentes, cujo desenvolvimento e progressão são afetados por variados fatores como a radiação ultravioleta, o fenótipo e o genótipo. Em condições normais, através de um complexo sistema de fatores de crescimento parácrinos e moléculas de adesão celular, os queratinócitos controlam o crescimento e o comportamento dos melanócitos. A perda desse controle leva ao desenvolvimento do tumor. Várias abordagens terapêuticas têm sido utilizadas no tratamento do MM. Entretanto, ainda há a necessidade de alternativas realmente eficazes contra o MM. A guanosina quando utilizada em conjunto com outras drogas antitumorais, como acriflavina, permite a utilização de menores dosagens destes quimioterápicos para a obtenção do mesmo efeito terapêutico. Neste trabalho mostramos que em células de melanoma, da linhagem B16F10, a guanosina demonstrou ter um efeito citostático. O tratamento de B16F10 com 1 mM guanosina diminuiu significativamente a proliferação destas células e ainda promoveu uma alteração morfológica drástica,. Além disso, este nucleosídeo também induziu um aumento na produção de melanina, analisada por microscopia eletrônica de transmissão e uma diminuição da migração celular, determinada pelo método "*scratching*", indicando que a guanosina direciona B16F10 a um fenótipo mais diferenciado. A guanosina estimulou uma ativação sustentada de ERK 1/2. Empregando um inibidor da ERK (peptídeo 1) mostramos que a alteração morfológica e a melanogênese induzida por guanosina são dependentes destas proteínas. A inibição da fosforilação de ERK pela inibição da PKC por bis-indolmaleimida (BIM) mostrou que a ativação da ERK é dependente da ativação da PKC. Entretanto, não foi observado um aumento da concentração de cAMP intracelular em células tratadas com a guanosina, diferentemente de estímulos melanogênicos clássicos. Portanto, o tratamento de células B16F10 com guanosina induz modificações morfológicas e diferenciação celular, possivelmente refletindo um fenótipo menos agressivo, dependentes da ativação da via PKC-ERK.

Palavras chave: Guanosina. Diferenciação de B16F10. Melanoma. MAP quinase. Proteína Quinase C.

ABSTRACT

Malignant melanoma (MM) is one of the most aggressive cancers, whose development and progression are affected by several factors, such as ultraviolet radiation, cell phenotype and genotype. In normal conditions, keratinocytes control melanocytes growth and behavior through a complex system of paracrine growth factors and cell adhesion molecules. Loss of this control drives tumor progression. Different therapeutic approaches have been used in MM treatment. However, effective anti-melanoma drugs are still required. Guanosine, when administered with antitumors, as acriflavine, allows that lower doses of such chemotherapeutic drugs produce the same therapeutic effects. In this work, we showed that guanosine has a citostatic effect in B16F10 melanoma cells. Treatment of B16F10 with 1 mM guanosine significantly decreased cell proliferation and induced a remarkable morphological alteration. In addition, this nucleoside also induced an increased melanin production, analysed by transmission electronic microscopy, and a decreased cell migration, determined by scratching method, indicating that guanosine induces a more differentiated phenotype in B16F10. Guanosine stimulated a sustained ERK activation. Using peptide 1, an ERK 1/2 inhibitor, we showed that both morphological alteration and melanogenesis are dependent on these proteins. ERK phosphorylation inhibition was observed when PKC was inhibited by bis-indolmaleimide (BIM), demonstrating that ERK activation is dependent on PKC activation. However, no intracellular cAMP increase was observed in guanosine-treated cells, differently from the classical melanogenic stimuli. Therefore, B16F10 treatment with guanosine induce cellular shape alterations and differentiation, possibly reflecting a less aggressive state, dependent on PKC-ERK pathway.

Key words: Guanosine. B16F10 differentiation. Melanoma. MAP kinase. Protein kinase C.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosina trifosfato
BIM – Bis indol maleimida
cAMP – Adenosina monofosfato
CO₂ – Dióxido de carbono
Conc. – Concentração
DMSO – Dimetilsulfóxido
ERK – Quinase regulada por sinal extracelular
Forsk. – Forscolina
GMP – Guanosina monofosfato
GTP – Guanosina trifosfato
Guo – Guanosina
HBSS – Solução balanceada de sal de Hank
MAP – Proteína ativada por mitógeno
MIA – Atividade inibitória de melanoma
MM – Melanoma metastático/cutâneo
MSH – Hormônio estimulador de melanócito
MTT – Metiltiazoltetrazólio
NaOH – Hidróxido de sódio
NGF – Fator de crescimento de nervo
NSB – Ligação não específica
PFA – Paraformaldeído
PI₃ – Inositol 1,4,5 – trifosfato
PKC – Proteína quinase C
PLC – Fosfolipase C
RGP – Crescimento radial primitivo
SFB – Soro fetal bovino
TEMED – N,N,N,N – tetrametil etilenodiamina
UV – Ultravioleta
VGP – Crescimento vertical avançado

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – GUANOSINA NÃO POSSUI ATIVIDADE CITOTÓXICA EM
CÉLULAS B16F10

37

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – GUANOSINA INDUZ DIMINUIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10	35
FIGURA 2 – GUANOSINA INDUZ ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM B16F10	38
FIGURA 3 – NÚMERO DE CÉLULAS COM PROLONGAMENTOS MAIORES QUE TRÊS CORPOS CELULARES AUMENTAM EM CÉLULAS TRATADAS COM GUANOSINA	39
FIGURA 4 – GUANOSINA AUMENTA A SÍNTESE DE MELANINA	40
FIGURA 5 – GUANOSINA INIBE A MIGRAÇÃO CELULAR	42
FIGURA 6 – INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR GUANOSINA É INDEPENDENTE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	43
FIGURA 7 – ATIVAÇÃO DA ERK 1/2 NA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS B16F10 INDUZIDA POR GUANOSINA	44
FIGURA 8 – BLOQUEIO DA ATIVAÇÃO DA ERK 1/2 REVERTE MUDANÇAS MORFOLÓGICAS INDUZIDAS POR GUANOSINA	45
FIGURA 9 – ATIVAÇÃO DA ERK 1/2 ESTÁ ENVOLVIDA NO AUMENTO DA SÍNTESE DE MELANINA INDUZIDA POR GUANOSINA	46
FIGURA 10 – DIFERENCIAÇÃO DE B16F10 INDUZIDA POR GUANOSINA OCORRE POR MECANISMOS INDEPENDENTES DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE cAMP	47
FIGURA 11 – AKT NÃO ESTÁ ATIVADA EM CÉLULAS TRATADAS COM GUANOSINA	47
FIGURA 12 – BLOQUEIO DA PKC INIBE A FOSFORILAÇÃO DA ERK 1/2 INDUZIDA POR GUANOSINA	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVOS	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Cultura Celular	22
4.2 Solução Estoque de Guanosina	22
4.3 Ensaio de Proliferação	22
4.3.1 Método MTT	22
4.3.2 Método Coloração com Cristal Violeta	23
4.3.3 Método Contagem em Citometria de Fluxo	24
4.4 Ensaio de Viabilidade	24
4.5 Análise Morfológica	25
4.6 Análise do Conteúdo de Melanina	26
4.7 Análise Ultraestrutural	27
4.8 Ensaio de Migração	27
4.9 Preparação dos Extratos Celulares	28
4.10 SDS-PAGE	29
4.11 Western Blot	30
4.12 Análise da concentração de cAMP intracelular	31
4.12.1 Preparação dos Padrões (para realização da curva padrão)	31
4.12.2 Mensuração do cAMP intracelular	31
4.12.3 Análise da ativação da PKC e PLC	32
5 RESULTADOS	34
5.1 Efeitos da guanosina sobre a proliferação celular	34
5.2 Guanosina induz a diferenciação de B16F10	37
5.3 Guanosina diminui a migração de B16F10	41
5.4 Ativação da ERK 1/2 e da PKC contribuem para a diferenciação de B16F10 ...	42
DISCUSSÃO	49
CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	55

1 INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo, ou melanoma metastático, representa uma das malignidades mais agressivas existentes em humanos, cuja incidência tem aumentado rapidamente desde a década de 60 (MEIER *et al.*, 1998; BALDI *et al.*, 2003; LAHN *et al.*, 2004; LEVERKUS *et al.*, 2006). Apesar dos esforços de pessoas do mundo inteiro para fortalecer a prevenção, melhorar o diagnóstico e o tratamento, a incidência de melanoma continua em índices alarmantes (MEIER *et al.*, 1998). A média de sobrevivência dos pacientes fica entre 6 e 9 meses (ANDERSON *et al.*, 1995; SERRONE *et al.*, 1999; CHIN *et al.*, 2006; PRIGNANO *et al.*, 2002), sendo poucos os casos, menos de 5%, que ultrapassam 5 anos de sobrevida (ANDERSON *et al.*, 1995; PRIGNANO *et al.*, 2002; QUEIROLO *et al.*, 2005b). O melanoma metastático (MM) é geralmente muito resistente aos tratamentos utilizados (ANDERSON *et al.*, 1995; SERRONE *et al.*, 1999; PRIGNANO *et al.*, 2002; SOENGAS *et al.*, 2003; CHIN *et al.*, 2006), sendo, portanto, de difícil cura.

Radiações ultravioletas em combinação com genótipo, fenótipo e imunomodulação afetam o desenvolvimento e a progressão do melanoma. Fatores de risco incluem pele sensível à luz solar, predisposição genética, entre outros (LAHN *et al.*, 2004).

Cinco estágios da progressão do melanoma são frequentemente propostos de acordo com a clínica apresentada pelos pacientes e as características histopatológicas do tumor (MEIER *et al.*, 1998; BALDI *et al.*, 2003). São eles: nevus congênito ou comumente adquirido, com características estruturais normais de melanócitos; nevus displásico com estrutura e arquitetura atípica; fase de crescimento radial primitivo em melanoma primário (RGP); fase de crescimento vertical avançado em melanoma primário (VGP), com potencial metastático; e melanoma metastático. Entretanto, há uma dificuldade da correta avaliação do estágio em que o tumor se encontra devido à falta de marcadores que possam ser eficazmente co-relacionados com os estágios da doença (GARBE, 2005). Um maior entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na transformação e progressão do melanoma é necessário para o estudo de marcadores e abordagens terapêuticas eficazes para a doença (MEIER *et al.*, 1998; BALDI *et al.*, 2003).

Em condições normais, o controle do crescimento dos melanócitos é realizado pelos queratinócitos, através de sinalização parácrina com fatores de crescimento e moléculas de adesão célula-célula. Existem aproximadamente 36 queratinócitos associados a 1 melanócito. Quando há um sinal indicando para que o melanócito prolifere, este se solta da membrana basal e dos queratinócitos, retrai seus dendritos, promove a divisão celular e migra novamente até a membrana basal, onde se re-acopla à matriz extracelular e aos queratinócitos (HAASS *et al.*, 2005).

O controle da proliferação exercida pelos queratinócitos sobre os melanócitos ocorre de três maneiras: 1) sinalização parácrina com fatores de crescimento, 2) sinalização intracelular através de transdução de sinal e segundos mensageiros, e 3) sinalização intercelular com moléculas de adesão célula-célula, célula-matriz e junções tipo fenda (HAASS *et al.*, 2004). Portanto, mecanismos de escape utilizados pelos melanócitos para burlar o controle exercido pelos queratinócitos estão envolvidos com as sinalizações citadas acima. Então, para fugir do controle dos queratinócitos, os melanócitos utilizam os seguintes mecanismos: 1) diminuição da expressão dos receptores importantes na comunicação com os queratinócitos, como por exemplo, E-caderina, P-caderina e conexinas (MEIER *et al.*, 1998; HAASS *et al.*, 2005), 2) super expressão de receptores e moléculas de sinalização não encontradas normalmente em melanócitos, porém importantes para interação entre melanoma-melanoma e melanoma-fibroblasto, como por exemplo, N-caderina e Mel-CAM, e 3) perda de adesão na membrana basal pela expressão alterada das proteínas da família das integrinas, responsáveis pela ligação com a matriz extracelular (HAASS *et al.*, 2005). Enquanto os melanócitos apresentam alta expressão de E-caderinas e desmoleínas, que são responsáveis pela adesão melanócito-queratinócito, os melanomas suprimem essa expressão e passam a expressar em sua superfície proteínas que vão promover a adesão das células de melanoma entre elas próprias e entre fibroblastos e células endoteliais do estroma do tumor (HAASS *et al.*, 2005). Sendo a interação com vários componentes da matriz extracelular um fator extremamente importante na expansão metastática do tumor (HAASS *et al.*, 2005), a alteração da composição dos receptores de matriz extracelular reflete nas propriedades invasivas do melanoma (NESBIT *et al.*, 1994; JOHNSON, 1999). Portanto, os fatores presentes no micro ambiente tumoral, como por exemplo, as sinalizações célula-célula e célula-matriz são críticos no fenótipo metastático (MEIER *et al.*, 1998).

O mecanismo molecular exato que leva à desregulação da homeostase que envolve os melanócitos é ainda desconhecido (HAASS *et al.*, 2005). Menos se sabe sobre anormalidades genéticas em melanomas em relação a outros cânceres, como leucemias, linfomas, gliomas e vários carcinomas (MEIER *et al.*, 1998). Porém, a transformação de melanócitos em melanomas ocorre por causa de mutações gênicas em aproximadamente 25 a 40% dos casos (GHIORZO, 2003).

Alguns marcadores têm sido pesquisados para definir qual estágio se encontra o tumor e até detectar sua presença e metástase. Investigações por métodos de imagens (ressonância magnética e tomografia computadorizada, por exemplo) são importantes na detecção inicial do melanoma cutâneo, porém, são ineficientes na maioria das vezes na detecção de metástases e ainda produzem cerca de 7% de falsos positivos (GARBE, 2005). As proteínas S-100 β e MIA (atividade inibitória de melanoma) são marcadores tumorais promissores, sendo apropriadas para o monitoramento tumoral (GARBE, 2005). Em um estudo realizado por PRIGNANO *et al.*, 2002, amostras de células de melanoma metastático de cinco pacientes diferentes foram mantidas em cultura celular e analisadas quanto à expressão de alguns antígenos. Todas as células estudadas apresentaram os antígenos S-100 e HM-B45 (PRIGNANO *et al.*, 2002). Pelo método de RT-PCR, tem-se pesquisado a presença da enzima chave na biossíntese de melanina, a tirosinase, para detectar células tumorais em sangue periférico (GARBE, 2005). A utilização da técnica de microarranjo de cDNA também tem sido utilizada para determinar e comparar a expressão gênica em melanoma, permitindo assim uma classificação molecular da doença e consequentemente, um aumento da probabilidade de detectar a metástase tumoral (BALDI *et al.*, 2003). Com a utilização desta técnica, BALDI *et al.*, 2003 identificaram 12 genes que podem ser possíveis candidatos a marcadores tumorais, apresentando alto nível de expressão em células de melanoma.

Algumas abordagens terapêuticas têm sido utilizadas para tentar melhorar o tratamento do melanoma cutâneo. Uma eficácia terapêutica, onde há um balanço entre benefício e toxicidade em relação à dose-resposta, tem sido muito estudada (QUEIROLO *et al.*, 2005b). Quimioterapia e imunoterapia têm sido utilizadas isoladamente, ou em associação com vacinas e anticorpos monoclonais (QUEIROLO *et al.*, 2005b). A utilização de interferons, por exemplo, o interferon alfa-2, no tratamento de células tumorais não possui um efeito citotóxico direto sobre o

melanoma metastático, porém, seus efeitos imunomodulatórios são bastante importantes (KIRKWOOD *et al.*, 1990; FRANK *et al.*, 1995; PRIGNANO *et al.*, 2002b). Entre esses efeitos, os interferons são antiproliferativos e possuem a capacidade de aumentar diretamente a atividade de células matadoras naturais do sistema imune (KIRKWOOD *et al.*, 1990; PRIGNANO *et al.*, 2002). Portanto, a administração de interferon alfa-2 em conjunto com outras drogas produz benefícios significantes em relação à ausência de reincidência e/ou aumento da sobrevivência (QUEIROLO *et al.*, 2005b).

O tratamento com a droga Dacarbazina sozinha não produz efeitos relevantes, porém, quando utilizada em conjunto com interferon alfa produz uma melhora na média de sobrevivência dos pacientes (QUEIROLO *et al.*, 2005a). A administração conjunta de talidomida, um agente angiogênico, com temozolomide também demonstrou atividade em melanoma metastático (HWU *et al.*, 2003). BAY (BAY43-9006) têm prevenido a proliferação e angiogênese por bloqueio direto da Raf quinase e receptores de tirosina quinase de fator de crescimento vascular endotelial e fator de crescimento derivado de plaquetas (QUEIROLO *et al.*, 2005a).

A guanosina, objeto de estudo do nosso trabalho, também tem sido utilizada em conjunto com outras drogas para avaliação dos seus efeitos em diversas células tumorais (IIGO *et al.*, 1984; IIGO *et al.*, 1987; KIM *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2007). A guanosina potencializa os efeitos antitumorais de pirimidinas fluoradas (IIGO *et al.*, 1984). Nas linhagens celulares de leucemia P388 e de mastocitoma P815, a guanosina aumenta significativamente a atividade antitumoral da droga 5'-deoxi-5-fluorouridina (IIGO *et al.*, 1987). Quando a guanosina é utilizada concomitantemente em doses iguais com a droga antitumoral Acriflavina, aumenta os efeitos exercidos por esta (KIM *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2007). No tratamento conjunto das drogas em tumores ascíticos e sólidos implantados em modelos animais, ocorre um aumento na inibição do crescimento tumoral de 65% e uma diminuição na massa tumoral de 96%, sendo significativamente menores os valores encontrados somente com o tratamento com Acriflavina. Neste tratamento, ocorre um bloqueio do transporte de nutrientes pela membrana plasmática e uma perturbação na produção celular de ATP (KIM *et al.*, 1997).

Há também alguns estudos envolvendo compostos relacionados com a guanosina, demonstrando que estes, como já descrito anteriormente para a guanosina, também possuem efeitos de potenciadores de drogas antitumorais.

Porém, não há estudos demonstrando efeitos da guanosina em melanomas. Assim como a guanosina, a guanosina 5'-monofosfato (GMP) promove um aumento dos efeitos causados pela droga 5-fluorouracil em células tumorais (ILIGO *et al.*, 1983)

Outra abordagem terapêutica extremamente importante é a utilização de drogas que promovem apoptose da célula tumoral (LAVRIK *et al.*, 2005). Estudos sugerem que os melanomas tornam-se quimiorresistentes a uma variedade de drogas antitumorais por utilizar uma resistência a apoptose e por reprogramar suas vias de proliferação e sobrevivência durante a progressão do melanoma (revisado por SOENGAS *et al.*, 2003). A identificação de moléculas envolvidas com a regulação e a execução da apoptose têm sido muito úteis no estudo de alterações em melanomas e outros tumores. Os executores apoptóticos primários são uma série de proteases denominadas caspases, que agem em forma de cascata, desencadeando a apoptose (revisado por SOENGAS *et al.*, 2003). A regulação da ativação da via das caspases, responsável por desencadear a apoptose, é feita por inibidores de iniciadores das caspases, como o cFLIP (BULLANI *et al.*, 2001; LEVERKUS *et al.*, 2005), por exemplo. Em melanomas, este inibidor encontra-se ativo (BULLANI *et al.*, 2001), necessitando, portanto, de drogas que bloqueiem este sistema para que a apoptose possa ser induzida nestas células tumorais. Outra droga pró-apoptótica é o Oblimersen, que promove a inibição do Bcl-2 (QUEIROLO *et al.*, 2005a), um oncogene que previne a apoptose (SOENGAS *et al.*, 2003) levando a uma indução da apoptose (QUEIROLO *et al.*, 2005a).

Um alvo mais recente de pesquisa para o desenvolvimento de drogas anti-câncer é a proteína quinase C (PKC). Normalmente, esta proteína está envolvida em processos de transdução de sinais para promover proliferação e diferenciação celular (revisado por MACKAY *et al.*, 2003). Como a PKC possui um importante papel em transformações neoplásicas, carcinogênese e invasão tumoral, torna-se um importante alvo de pesquisa de terapias anticâncer (MACKAY *et al.*, 2003). Estudos têm sido realizados sobre as funções das isoformas da PKC na proliferação, transformação e metástases em melanoma (OKA *et al.*, 2005). As várias isoformas descritas de PKC são classificadas em três grupos de acordo com sua estrutura e domínio regulatório (LAHN *et al.*, 2004; OKA *et al.*, 2005): grupo A ou clássico (PKC- α , β I, β II, e γ), grupo B ou novo (PKC- Δ , ϵ , η , θ e μ) e grupo C ou atípico (PKC- λ e ς).

As diferentes isoformas da PKC apresentam distribuição distinta em diferentes células e tecidos (OKA *et al.*, 2005). Existem evidências que sugerem que os membros da família PKC são ativados em compartimentos intracelulares distintos por diferentes meios e que também possuem papéis distintos nas funções celulares (revisado por NISHIZUKA, 1995). A PKC γ foi encontrada apenas em células neuronais (revisado por OKA *et al.*, 2005). A superexpressão da PKC ϵ resulta em tumorigênese, levando sua classificação como um oncogene (revisado por WATTERS *et al.*, 1999), enquanto que a ativação da PKC δ apresenta um papel de supressor tumoral (revisado por WATTERS *et al.*, 1999; MACKAY *et al.*, 2003). A ativação da isoforma PKC- α é associada com proliferação celular, invasividade e diminuição da diferenciação em modelos de melanoma (revisado por MACKAY *et al.*, 2003; LAHN *et al.*, 2004; OKA *et al.*, 2005), sendo, portanto, esta isoforma e a isoforma ϵ importantes alvos de drogas antitumorais.

Outra via de sinalização importante na transformação maligna de células é a via das MAP quinases (proteínas ativadas por mitógenos). A família das MAP quinases possui um importante papel em complexos programas celulares como proliferação, diferenciação, transformação e apoptose (revisado por LACAL, 1997; SCHAEFFER *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2002; CHANG *et al.*, 2003; PLATANIAS, 2003). As proteínas dessa cascata amplificam e integram diversos sinais extracelulares e então promovem a resposta fisiológica adequada de acordo com cada estímulo. Até o presente momento, três famílias das MAPK foram identificadas: sinal extracelular regulado por quinase (ERK), jun quinase (JNK/SAPK) e p38 MAPK (SCHAEFFER *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2002; PLATANIAS, 2003).

A proteína p38 MAPK parece estar envolvida em processos de apoptose, diferenciação, sobrevivência, proliferação, desenvolvimento, inflamação e outras respostas induzidas por estresse. Esta via é preferencialmente ativada por vários tipos de estresses celulares, como irradiação por luz ultravioleta (UV), choque térmico, estresse osmótico e lipopolissacarídeos, por exemplo. São conhecidas quatro isoformas de p38: α , β , γ e δ , e todas podem ser ativadas pela MAPK kinase MKK6 (ZHANG *et al.*, 2002).

A via de sinalização JNK está envolvida em sinais como apoptose, e proliferação. Ela também foi descrita como via transdutora de sinal em processos de diferenciação em sistemas hematopoiéticos e desenvolvimento de embriões. A

ativação de JNK também pode ser associada com transformações em muitos oncogenes. Existem três genes que codificam a proteína JNK, com doze isoformas possíveis derivadas de produtos de rearranjo alternativo de mRNA (ZHANG *et al.*, 2002).

A via Raf-MEK-ERK representa uma das mais bem caracterizadas vias de sinalização descritas. Ela está principalmente envolvida com processos de proliferação e diferenciação. Receptores de tirosina quinase ou receptores acoplados à proteína G são capazes de promover a ativação da MAPKKK (Raf), que por sua vez, quando ativadas, ativam a MAPKK (MEK1 e MEK2). Finalmente, a MAPKK ativada promove a fosforilação das proteínas ERK1 e ERK2 (MAPK), ativando-as (revisado por ZHANG *et al.*, 2002). Após sua ativação, a p-ERK1/2 translocam para o núcleo e ativam fatores de transcrição, alterando a expressão de genes que promovem crescimento celular ou diferenciação (revisado por ZHANG *et al.*, 2002; KONDOH *et al.*, 2005).

Estudos demonstraram que existe a participação da via Raf-MEK-ERK na geração de respostas mitogênicas em todas as malignidades hematológicas, como leucemias, linfomas e mieloma múltiplo (revisado por PLATANIAS, 2003). Também sabe-se que esta via de sinalização está envolvida com a transformação de outros tipos de câncer, como por exemplo, carcinoma renal, carcinoma hepatocelular, cancer de pulmão (GOLLOB *et al.*, 2006) e melanomas (SMALLEY, 1992; GOLLOB *et al.*, 2006; PANKA *et al.*, 2006).

A guanosina, substância utilizada em nosso trabalho, além da propriedade anteriormente citada de aumentar os efeitos de drogas antitumorais, também possui vários outros efeitos celulares. Nucleosídeos purínicos, como a guanosina, a adenosina e suas bases, como guanina e adenina, assim como também os nucleotídeos purínicos (adenosina 5'-trifosfato e guanosina 5'-trifosfato) são liberados no espaço extracelular, onde agem como moléculas sinalizadoras intercelular (RATHBONE *et al.*, 1999). No sistema nervoso central, essas substâncias podem mediar vários efeitos, como neurotransmissão e efeitos tróficos que induzem mudanças no metabolismo, estrutura e função celular (RATHBONE *et al.*, 1999).

In vivo, concentrações extracelulares de purinas dependem do equilíbrio entre a liberação de purinas pelas células e sua recaptação, assim como do metabolismo

extracelular. *In vitro*, a guanosina é um potente estimulador do crescimento axonal (RATHBONE *et al.*, 1999).

Em um estudo realizado por PETERSEN (1999), o aumento da concentração de guanosina em cultura de *Escherichia coli* promove uma inibição do crescimento celular bacteriano em cepas mutadas para o gene *gsk-3*, gene estrutural da guanosina quinase. Esta enzima promove a fosforilação da guanosina, transformando-a em GMP (guanosina 5'-monofosfato). GMP é então fosforilado por outras enzimas para formar GDP e subsequentemente GTP. Com a mutação do gene *gsk-3*, há um acúmulo de guanosina na célula bacteriana, levando assim a um aumento de sua concentração. Essa concentração elevada de guanosina provoca mudanças metabólicas e parada do crescimento celular bacteriano (PETERSEN, 1999).

No sistema nervoso central a guanosina promove vários efeitos neuroprotetores. (JURKOWITZ *et al.*, 1998; LITSKY *et al.*, 1999; VINADÉ *et al.*, 2003; FRIZZO *et al.*, 2005; MORETTO *et al.*, 2005). Em situação de privação de glicose e inibição mitocondrial em células gliais da linhagem ROC-1, a guanosina protege estas células nestas condições de depleção de energia (JURKOWITZ *et al.*, 1998). Através da via das pentoses, a guanosina é convertida a intermediários glicolíticos fosforilados, liberando sua respectiva base, guanina, e ribose-1-fosfato, que é subsequentemente catabolizado pela via glicolítica, provendo assim o ATP necessário para manter os níveis celulares adequados (JURKOWITZ *et al.*, 1998). Em condições de hipóxia quimicamente provocada por rotenona, guanosina preserva a viabilidade de células neuronais e gliais por fosforilação de nucleosídeos purínicos (LITSKY *et al.*, 1999). O mecanismo proposto para esta proteção é que a guanosina é convertida em sua respectiva base, a guanina, e ribose-1-fosfato pela via de nucleosídeos purínicos fosforilase, podendo assim ser utilizada como energia alternativa em condições de hipóxia ou isquemia (LITSKY *et al.*, 1999). Estes resultados demonstram que a guanosina tem a capacidade de, numa situação de falta de energia (ATP) para a célula, proteger a mesma através de mecanismos que levam a produção de ATP com o suprimento de guanosina fornecido, permitindo que a célula não sofra tantos danos pela ausência de ATP.

Em camundongos, a guanosina também exerce efeitos anticonvulsivantes, amnésicos e ansiolíticos quando administrada em doses agudas (LARA *et al.*, 2001) e crônicas (VINADÉ *et al.*, 2003). Administração oral e intraperitoneal em doses

agudas de guanosina previnem convulsões induzidas por ácido quinolônico em ratos e camundongos (LARA *et al.*, 2001). Administrações crônicas (durante 2 semanas) de uma dose de 0,5mg/ml adicionada à água dos camundongos previne convulsões induzidas por α -dendrotoxina em 40% e reduz a mortalidade dos animais tratados em 50% (VINADÉ *et al.*, 2003). Além dos efeitos anticonvulsivos, doses crônicas também apresentam efeitos ansiolíticos e amnésicos nos animais testados (VINADÉ *et al.*, 2003).

Outros efeitos observados no sistema nervoso central induzidos pela guanosina são o aumento da capacidade do transporte de glutamato no cérebro (FRIZZO *et al.*, 2005) e a recaptação de glutamato no cérebro após injúria por hipóxia-isquemia (MORETTO *et al.*, 2005). Em cultura de fatias corticais do cérebro, foi avaliado a recaptação de glutamato nas células tratadas com 100 μ M de guanosina. Nessas condições, a recaptação é significativamente aumentada (FRIZZO *et al.*, 2005). O glutamato é um neurotransmissor importante, porém encontra-se aumentado em algumas condições patológicas, como isquemia cerebral, por exemplo. O papel da guanosina na recaptação do glutamato firma o papel neuroprotetor desta (FRIZZO *et al.*, 2005). MORETTO *et al.* (2005) demonstraram que após uma hipóxia-isquemia cerebral induzida em ratos neonatais, a recaptação de glutamato era aumentada na presença de guanosina. O tratamento com guanosina na concentração de 7,5 mg/kg imediatamente antes e depois da injúria nos animais produziu efeito em ambas as situações.

A guanosina também apresenta a capacidade de aumentar o crescimento de neuritos em células da linhagem PC12 (feocromocitoma de rato) induzidos por fator de crescimento de nervo (NGF) (GYSBERS *et al.*, 1995; GYSBERS *et al.*, 1996). Quando as células PC12 são tratadas com 300 μ M de guanosina ocorre um aumento da extensão de neuritos por estas células em aproximadamente 3,5% em relação a células controle (GYSBERS *et al.*, 1995). Um efeito sinérgico pode ser observado quando as células PC12 são tratadas com NGF e guanosina, aumentando o crescimento de neuritos para 40-65% em relação a células tratadas somente com NGF, que apresentam um aumento nos neuritos de 20-30% em 48 horas de tratamento (GYSBERS *et al.*, 1995). Além do aumento no número de neuritos, ocorreu também um aumento no número de arborescência por neuritos, estes, com características axonais específicas de neurofilamentos (GYSBERS *et al.*,

1995). Este crescimento de neuritos observado é ocasionado por mecanismos dependentes e independentes de cAMP (adenosina monofosfato cíclico) (GYSBERS *et al.*, 1996). O tratamento com guanosina aumenta a concentração de cAMP intracelular, porém, quando utiliza-se um inibidor da adenilato ciclase (enzima que promove o aumento da concentração de cAMP intracelular), o aumento do cAMP intracelular é completamente bloqueado, mas o crescimento de neuritos, apesar de diminuir, não é completamente extinto (GYSBERS *et al.*, 1996).

Estudos recentes sugerem a presença de um receptor de guanosina no cérebro (TRAVERSA *et al.*, 2002; TRAVERSA *et al.*, 2003). TRAVERSA *et al.* (2002) demonstraram que [³H]-guanosina liga-se em sítios específicos detectados em preparações de membranas de cérebros de ratos. Adição de GTP (guanosina trifosfato) diminui esta ligação de uma maneira dose-dependente, sugerindo então a possibilidade da existência de um receptor de membrana específico para guanosina acoplado à proteína G no cérebro de ratos.

2 JUSTIFICATIVA

Existem vários estudos demonstrando que quando utilizada em conjunto com outras drogas antitumorais, a guanosina promove um aumento dos efeitos destas drogas (IIGO *et al.*, 1984; IIGO *et al.*, 1987; KIM *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2007), porém há uma deficiência de trabalhos que demonstrem como a guanosina atua molecularmente na célula. Portanto, a caracterização da resposta de células tumorais, como melanoma, ao tratamento com guanosina é extremamente importante para o desenvolvimento de novas drogas ou novos tratamentos adjuvantes mais eficazes e direcionadas à célula tumoral, diminuindo, portanto, a toxicidade quimioterápica às células normais do organismo e melhorando a qualidade de vida do paciente e a sua sobrevivência.

3 OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivos:

- A análise do comportamento de crescimento celular da linhagem de melanoma murino B16F10 frente ao tratamento com a guanosina;
- Análise morfológica das células tratadas com a guanosina;
- Análise da viabilidade celular após o tratamento com a concentração determinada de guanosina para o estudo;
- Análise de marcadores de diferenciação celular, como produção de melanina, atividade metaloprotease e capacidade de migração celular e;
- Investigação de vias de sinalização envolvidas na modulação fenotípica induzida pela guanosina em células B16F10.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura Celular

A linhagem celular B16F10 (melanoma murino) utilizada para a realização dos experimentos foi cultivada em meio RPMI 1640 suplementada com 10% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, Campinas, SP). O repique celular foi realizado 3 vezes por semana, numa proporção de 1:10. As células foram mantidas em estufa a 37° C contendo 5% de CO₂ e umidade controlada.

Para que houvesse sempre um estoque, as células foram congeladas em meio RPMI 1640 suplementado com 40% de SFB e 10% de DMSO (dimetilsulfóxido – Sigma, St. Louis, MO) em nitrogênio líquido.

4.2 Solução Estoque de guanosina

Guanosina (141,6mg, Sigma – St Louis, MO) foi dissolvida em 10 ml de NaOH 0,5 M (Sigma – St Louis, MO) para que a solução estoque ficasse em uma concentração de 50 mM. As soluções de guanosina e NaOH (controle) foram então filtradas em membrana (Millipore) de 0,22 µm, divididas em alíquotas de 1 ml em tubos estéreis e estocadas a –20° C.

4.3 Ensaio de Proliferação

4.3.1 Método MTT

Em uma placa de 96 poços, 5×10^3 células B16F10/poço foram plaqueadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. Após 16 horas, o meio dos poços foi trocado para RPMI contendo 0,1% de SFB e deixado durante aproximadamente 24 horas a 37° C com 5% de CO₂ e atmosfera umidificada (95%).

Após este período, as células foram tratadas com 1 mM de guanosina ou volumes equivalentes do seu veículo (NaOH 0,5 M) e incubadas durante 24 ou 48 horas na presença do tratamento.

Uma solução 5×10^{-4} g/ml de MTT (Metiltiazoltetrazolio) foi preparada em HBSS (Solução Balanceada de Sal de Hank) e após aspirado o meio dos poços cuidadosamente, 200 μ l da solução de MTT foram colocadas em cada poço, obtendo-se então uma concentração de 0,1 mg de MTT/poço. As células foram incubadas em estufa de CO₂ a 37° C durante 3 horas. O meio contendo MTT foi cuidadosamente retirado e 200 μ l de DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma) foram adicionados em cada poço. O meio foi homogeneizado 10 vezes. O conteúdo de cada poço foi transferido para uma outra placa de 96 poços devidamente identificada. A leitura da absorbância foi realizada em um comprimento de onda de 550 nm e descontados os valores de absorbância de 655 nm. Os tratamentos foram realizados em quintuplicata.

4.3.2 Método Coloração com Cristal Violeta

Em uma placa de 96 poços, células B16F10 foram plaqueadas a uma densidade de 5×10^3 células/poço em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e incubadas em estufa de CO₂ a 37° C com atmosfera umidificada (95%) durante 3 horas. Após este período, o meio foi substituído por RPMI suplementado com 0,1 % de SFB e as células mantidas, sob as mesmas condições de cultivo citadas anteriormente, durante 24 horas. As células foram então tratadas com 1 mM de guanosina ou quantidades equivalentes de NaOH 0,5 M durante 24 ou 48 horas.

O meio dos poços foi retirado cuidadosamente com o auxílio de uma micropipeta do tipo P1000 e as células foram delicadamente lavadas com 200 μ l de PBS. Retirado o PBS, 100 μ l de PFA 3% (paraformaldeído) foram colocados em cada poço e mantidos durante 10 minutos para que ocorresse a fixação das células. Após retirado o agente fixador, 100 μ l de metanol 2% foi colocado em cada poço e incubado durante 10 minutos. As células foram então coradas durante 10 minutos com 30 μ l de Cristal Violeta 0,5% (em Metanol 20%). Os poços foram lavados 2

vezes com 300 μ l de água e o corante foi extraído com 100 μ l de Citrato de Sódio 0,1 M (em Metanol 50%, pH 4,2). A leitura da placa foi realizada em uma absorbância de 550 nm. Os pontos foram realizados em quintuplicata.

4.3.3 Método Contagem em Citometria de Fluxo

Células B16F10 foram plaqueadas em placas de 6 poços a uma densidade de 2×10^5 células/poço em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e mantidas por aproximadamente 4 horas. Após este período, necessário para que ocorresse adesão celular, o meio dos poços foi trocado para RPMI 1640 suplementado com 0,1% de SFB e as células mantidas por 24 horas. Durante este período com carência de soro, ocorre uma sincronização do ciclo celular. As células foram então tratadas com diferentes concentrações de guanosina (0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mM) e mantidas em cultura durante 24 ou 48 horas em presença do tratamento. Quantidades equivalentes de NaOH 0,5M foram utilizadas como controle do experimento.

Após o período necessário de incubação com a droga, as células foram lavadas com PBS, soltas dos poços com quantidades iguais de PBS-EDTA e coletadas em um volume fixo de meio RPMI 1640 sem soro. Todas as amostras analisadas possuíam um mesmo volume final e foram submetidas à contagem em citometria de fluxo (BD FacsCalibur) durante 1 minuto, sob fluxo constante. Os dados foram analisados no software CellQuest (BD FacsCalibur). Os tratamentos e controles foram realizados em triplicata para cada experimento, em 3 experimentos independentes.

4.4 Ensaio de Viabilidade

Células de melanoma murino (B16F10) foram plaqueadas em placas de 24 poços a uma densidade de 2×10^5 células/poço com meio RPMI 1640 suplementado

com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas por aproximadamente 4 horas. Após este período, o meio dos poços foi trocado para RPMI 1640 suplementado com 0,1% de SFB e as células mantidas por 24 horas. As células foram então tratadas com diferentes concentrações de guanosina (0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mM) e mantidas em cultura durante 24 ou 48 horas em presença do tratamento. Quantidades equivalentes de NaOH 0,5 M foram utilizadas como controle do experimento.

O sobrenadante de cada poço foi coletado e reservado. As células foram lavadas com PBS, soltas dos poços com quantidades iguais (200 µl) de PBS-EDTA e coletadas em 300 µl meio RPMI 1640 com 10% de SFB. Após homogeneização, uma alíquota de 20 µl cada amostra (tanto do sobrenadante, quanto das células soltas) foi coletada e corada com quantidades iguais (20 µl) do corante vital azul de tripan 0,25%. As amostras foram analisadas em hemocítômetro (Neubauer Improved). Foram contadas as células coradas (inviáveis) e não coradas (viáveis). Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis. Os tratamentos e controles foram realizados em triplicata para cada experimento, em 3 experimentos independentes.

4.5 Análise Morfológica

Células B16F10 foram plaqueadas em placas de 35 mm em uma densidade de 5×10^4 células/poço em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e mantidas por aproximadamente 4 horas em estufa de CO₂. As diferentes concentrações de células utilizadas nos diferentes experimentos são devidas às necessidades de cada experimento. Após este período, o meio dos poços foi trocado para RPMI 1640 suplementado com 0,1% de SFB e as células mantidas por 24 horas. As células foram tratadas (em triplicata) com 1 mM de guanosina e mantidas em cultura durante 24 ou 48 horas em presença ou ausência da droga. Quantidades equivalentes de NaOH 0,5 M foram utilizadas como controle do experimento.

Após o tratamento, as células foram cuidadosamente fixadas com 100 µl de paraformaldeído 3% (Sigma – St Louis, MO) durante 10 minutos. Após cuidadosamente retirado o formaldeído, as células foram incubadas em 100 µl de

metanol 2% durante 10 minutos e então coradas com 0,25% de Cristal Violeta em metanol 20% por 10 minutos. Os poços foram cuidadosamente lavados 3 vezes com 300 μ l de água e as células foram analisadas em microscópio de luz. Os poços foram fotografados em vários campos aleatórios. As células que possuíam prolongamentos celulares maiores que três corpos celulares foram contabilizadas. Foram analisadas 250 células de cada tratamento.

Em alguns experimentos, 10 μ M do inibidor específico da ERK 1/2 (peptídeo 1, Calbiochem, San Diego – CA)) foi adicionado 30 minutos antes do tratamento com guanosina e mantido durante todo o tratamento. O tratamento foi realizado por 24 horas.

4.6 Análise do Conteúdo de Melanina

Células B16F10 foram plaqueadas em placas de 35 mm em uma densidade de 5×10^5 células/poço em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. Duas horas após o plaqueamento, o meio dos poços foi trocado para RPMI suplementado com 0,1 % de SFB e as células incubadas durante 24 horas em estufa de CO₂ a 37° C, com atmosfera umidificada (95%).

As células foram tratadas com 1 mM de guanosina ou quantidades equivalentes do veículo da droga (NaOH 0,5M) e mantidas durante 24 ou 48 horas em estufa 37° C. Os poços foram lavados com 2 ml de PBS-EDTA e as células foram destacadas da placa com tripsina. Após contagem em hemocítômetro (Neubauer Improved), 5×10^5 células foram coletadas em microtubos (Eppendorf) e centrifugadas em baixa velocidade até sedimentação das células. O sobrenadante foi retirado e as células ressuspensas em 500 μ l de NaOH 1M. As amostras foram mantidas em água fervente durante 1 hora e após o resfriamento, imediatamente foram realizadas as leituras das amostras em 490nm.

Para análise do conteúdo de melanina em presença do inibidor específico da ERK 1/2, peptídeo 1, as células foram previamente incubadas com 10 μ M do inibidor durante 30 minutos e então mantidas em presença de 1 mM de guanosina durante 48 horas. As células também foram mantidas em presença somente de 1 mM de

guanosina ou volumes equivalentes do veículo por 48 horas. As células foram destacadas da placa de cultura, coletadas em meio RPMI 1640 e centrifugadas em baixa rotação até formação de um precipitado de células. Os precipitados foram fotografados.

4.7 Análise Ultraestrutural

Placas de 100 mm de diâmetro, com 50% de confluência de células B16F10 foram tratadas com 1 mM de guanosina ou quantidades equivalentes de NaOH 0,5 M, durante 24 ou 48 horas. As células foram lavadas com PBS, soltas da placa de cultura com auxílio de tripsina e fixadas em solução de Karnovsky (2% de formaldeído, 2,5% de glutaraldeído em 0,1 mM de tampão cacodilato, pH 7,4) durante 16 horas a uma temperatura de 4° C.

As amostras foram tratadas com ósmio e embebidas em Epon-812. Cortes ultrafinos foram corados com 2% de acetato de uranila seguido por chumbo 2% nitrato/acetato.

Os cortes foram observados em microscópio eletrônico (Jeol 1200 EX II)

Foram contabilizadas células que continham grânulos de melanina.

4.8 Ensaio de Migração

Este ensaio foi procedido de acordo com Suyama *et al.* (2003). Foram utilizados placas de 35 mm previamente tratadas com 10 µg/ml de fibronectina (1 ml/poço). As células foram plaqueadas a uma densidade de 10⁶ células/poço com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. Quatro horas após o plaqueamento, uma linha de células foi completamente retirada com o auxílio de uma ponteira de micropipeta do tipo p-200. Os poços foram lavados com PBS para a completa retirada das células que foram mecanicamente destacadas da placa. As células foram então mantidas com 1 mM de guanosina ou volumes equivalentes do

veículo da droga durante 48 horas e fotografadas a cada 12 horas de tratamento. Utilizando-se as fotos do tempo zero dos tratamentos, foram traçadas duas linhas que delimitavam a área livre de células. As células que migraram para a área determinada foram contabilizadas. Foram realizados três experimentos independentes.

Células B16F10 foram tratadas com 1 mM de guanosina ou volumes equivalentes do seu veículo durante 24 h. Após este período, as células foram soltas com tripsina e ressuspensas em meio RPMI 1640 contendo 0,1% de SFB. $1,8 \times 10^5$ células (em 200 μ l de meio) foram plaqueadas em câmara de Boyden e incubadas durante 3 h em estufa a 37° C e 5% de CO₂. Como quimioatratante, foi utilizado meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB. As células foram então fixadas com metanol 100% e coradas com cristal violeta.

4.9 Preparação dos Extratos Celulares

Células foram plaqueadas a uma densidade de $7,5 \times 10^5$ células/poço em placas de 35mm de diâmetro com meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Após um período de 4 horas, o meio das células foi trocado para RPMI 1640 com 0,1% de SFB e incubadas por 24 horas.

As células foram tratadas com 1 mM de guanosina ou quantidades equivalentes do seu veículo (NaOH 0,5 M) durante 5, 15, 30, 60 ou 120 minutos. As placas foram então lavadas 1 vez com PBS gelado e, com as mesmas no gelo, foi colocado 50 μ l de tampão de lise (Hepes 20 mM, NaCl 15 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EGTA 1 mM, glicerol 10%, Triton X100 1%), acrescido de inibidores de protease (Iodoacetamida 0,01 M, Benzamidina 0,01 M, N-etil maleimida – NEM 0,001 M, 2-Fenantrolina 0,01 M, Fluoreto de Fenilmetil Sulfonil – PMSF 0,01 M) e de fosfatases (pirofosfato de sódio – NaPPi 0,001 M, fluoreto de sódio – NaF 0,005 M, orto-vanadato de sódio - Na₃VO₄ 0,001 M), em cada placa. As células ficaram lisando por 15 minutos. A cada 10 minutos, foi feita também uma lise mecânica com o auxílio de uma ponteira de micropipeta do tipo p-200.

O conteúdo de cada placa foi coletado separadamente em microtubos (Eppendorf) e centrifugado a uma velocidade de 10000 g durante 10 minutos a uma temperatura de 4° C. O sobrenadante de cada amostra foi coletado e o precipitado descartado.

A concentração de proteínas de cada amostra foi realizada pelo método de Bradford. As amostras foram armazenadas a -20° C.

Foram realizados 3 experimentos independentes.

4.10 SDS-PAGE

Foi utilizada a técnica de SDS-PAGE para a separação eletroforética das proteínas celulares de B16F10.

Quatro por cento de acrilamida/bis acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) contendo 0,4% de SDS (dodecil sulfato de sódio) foi a concentração utilizada para o gel de empilhamento. Para o gel de separação, foi utilizado uma concentração de 10% de acrilamida/bis acrilamida em tampão Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8) contendo 0,4% de SDS (dodecil sulfato de sódio). Agentes catalisadores (persulfato de amônio e N,N,N,N-tetrametil etilenodiamina – TEMED) foram adicionados em ambos os géis para que ocorresse a polimerização dos mesmos.

Quantidades iguais em miligramas de proteínas de cada amostra foram misturadas em tampão de amostra redutor (Tris-HCl 62 mM, pH 6,8, 0,2% de SDS, 10% de glicerol, 0,005% de azul de bromofenol e 50 mM de β -mercaptoetanol) na proporção de 1:4 (tampão de amostra:amostra) e fervidas durante aproximadamente 5 minutos.

As amostras foram cuidadosamente aplicadas nos poços dos géis e submetidas a uma corrente de 10 mA até a entrada das proteínas no gel de separação, com posterior aumento da corrente para 20 mA até a saída do gel da frente de migração. Marcadores de pesos moleculares (29, 45, 66, 97, 116 e 205 kDa) foram utilizados para determinação das massas das proteínas de interesse.

4.11 Western Blot

Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas e imobilizadas em membranas de nitrocelulose (GE – Piscataway, NJ) durante 1 hora sob voltagem constante de 100 V. Para a realização da transferência foi utilizado um tampão de transferência contendo 192 mM de glicina, 25 mM de Tris, 0,037% de SDS e 20% de metanol. Após este processo, as membranas foram coradas com vermelho de ponceau (0,2% de ponceau, 3% de ácido acético glacial) para a verificação da eficiência da transferência.

As membranas foram lavadas até a completa retirada do corante e incubadas durante uma hora com solução TBS-T (120 mM de NaCl, 20 mM de Tris e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite liofilizado, desnatado e desengordurado (Molico, Nestlé, SP) para que houvesse um bloqueio, com proteínas inertes ao experimento, dos sítios livres da membrana. Então, as membranas foram incubadas sob agitação, por 16 horas a 4° C, com soluções de anticorpos primários diluídos em tampão de bloqueio (TBS-T – leite). Os anticorpos primários e suas respectivas diluições utilizadas foram: camundongo anti-fosfo ERK 1/2, 1:500 (Sta Cruz Biotechnology); coelho anti-fosfo Akt, 1:1000 (Cell Signaling, Boston – MA); camundongo anti-fosfo SAPK/JNK, 1:500 (Cell Signaling, Boston – MA); Coelho anti-fosfo P38, 1:500 (Cell Signaling, Boston – MA); coelho anti-ERK 1/2, 1:500 (Cell Signaling, Boston - MA); coelho anti-Akt, 1:1000 (Cell Signaling, Boston – MA); coelho anti-SAPK/JNK, 1:500 (Cell Signaling, Boston – MA); coelho anti- P38, 1:500 (Cell Signaling, Boston – MA).

Após a lavagem das membranas com TBS-T por 3 vezes de 5 minutos cada, estas foram incubadas com o anticorpo secundário adequado em tampão de bloqueio por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação. Os anticorpos secundários utilizados foram: anti-IgG de camundongo HRP, 1:4000 (GE, Piscataway – NJ) e anti-IgG de coelho HRP, 1:2000 (GE, Piscataway – NJ). Novas lavagens foram feitas e as membranas foram então reagidas com o substrato (H₂O₂) e o luminol para a reação quimioluminescente (West Pico, Pierce – Rockford, IL). A membrana foi colocada entre duas folhas de filme plástico (transparência) e, no escuro, exposta a um filme autoradiográfico (Kodak) por tempos determinados até a obtenção do sinal, este verificado após revelação e fixação do filme.

4.12 Análise da concentração de cAMP intracelular

Uma diluição de 10^6 células/mL de meio RPMI acrescido de 10% de SFB foi preparada a partir de uma placa, de 100 mm de diâmetro, semi-confluyente com B16F10. Cem μ l desta diluição (10^5 células/poço) foram plaqueados em cada poço de uma placa de 96 poços. Após duas horas, o meio das células foi trocado para RPMI com 0,1% de SFB e deixados durante 16 horas em estufa a 37° C com 5% de CO₂ e 95% de umidade. As células foram então tratadas com 1 mM de guanosina ou volumes equivalentes do veículo durante 2, 10, 30 ou 60 minutos. Dez μ M de forskolina (Sigma – St Louis, MO) foram utilizados durante 10 minutos de tratamento como controle positivo.

Para determinação da concentração de cAMP nas amostras, foi utilizado um kit cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) System – RPN225 (GE, Piscataway – NJ). Os reagentes do kit foram reconstituídos conforme a bula do produto.

4.12.1 Preparação dos Padrões (para realização da curva padrão)

Seis microtubos de poliestireno foram identificados da seguinte maneira: 50, 100, 200, 400, 800 ou 1600 fmol. Cento e cinqüenta μ l do reagente 1B (2g de brometo de dodeciltrimetilamonio) foi colocado em cada tubo. No tubo identificado como 1600 fmol foi colocado 150 μ l do padrão de cAMP estoque (32 pmol/ml de cAMP) e homogeneizado em vortex. Cento e cinqüenta μ l desta solução foi colocado no tubo 800 fmol e procedido então uma diluição seriada em todos os tubos. Os pontos utilizados para a construção da curva padrão serão 50, 200, 400, 800 e 3200 fmol. As soluções padrões foram preparadas imediatamente anteriores ao seu uso.

4.12.2 Mensuração do cAMP intracelular

O sobrenadante dos poços foi aspirado com o auxílio de uma pipeta do tipo Pasteur acoplada a uma bomba de vácuo. Foram colocados 200 µl/poço do reagente de lise 1B (0,25% de brometo de dodeciltrimetilamônio) em cada poço. A placa foi agitada (à mão) de dois em dois minutos, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Cem µl de cada poço lisado foi colocado em seu respectivo poço em uma placa devidamente identificada de 96 poços (destacáveis) apropriada para o ensaio. Esta placa faz parte do kit e é revestida com anti-coelho Ig.

Em um poço determinado NSB (ligação não específica), foram colocados 100 µl do reagente de lise 1B e 100 µl do reagente de lise 2B (5 g de brometo de dodeciltrimetilamonio). No poço zero da curva padrão, foram colocados 100 µl do reagente 1B. Em cada poço apropriado, foram colocados 100 µl dos padrões preparados anteriormente. No poço correspondente a 3200 fmol de cAMP, foi colocado o volume determinado direto da solução estoque. Cem µl de anti-soro (coelho anti-cAMP) foram colocados em cada poço, exceto no NSB e no poço branco. A placa foi incubada por 2 horas no gelo (3 – 5° C).

Em todos os poços, exceto no branco, foram colocados 50 µl de cAMP conjugado com peroxidase e incubados por 1 hora. Os poços foram então lavados 4 vezes com tampão de lavagem (0,01 M de tampão fosfato e 0,05% de Tween 20, pH 7,5) e 150 µl do substrato (TMB 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) foram colocados em cada poço. Após 25 minutos de incubação, a reação foi interrompida com 100 µl de H₂SO₄ 1 M e a leitura da placa foi realizada em 450 nm.

4.13 Análise das vias de PKC e PLC

O plaqueamento foi procedido como descrito anteriormente no item 4.9 (preparação dos extratos celulares).

Trinta minutos antes da realização do tratamento com guanosina, algumas amostras foram submetidas a tratamentos com os inibidores BIM (3 µM, inibidor da proteína quinase C) e U73343 (5 µM, inibidor da fosfolipase C). Cinco µM de

U73122, um análogo de U73343 sem atividade inibitória da PLC, foi utilizado como controle. A guanosina (1 mM) ou volumes equivalentes do veículo foram mantidos durante 30 minutos em cultura.

Os extratos, os SDS-PAGE e os Western Blot foram procedidos como descritos anteriormente. Os anticorpos primários utilizados nos ensaios foram anti-fosfo ERK ½ de camundongo, 1:500 (Sta Cruz Biotechnology) e anti-ERK 1/2, 1:500 de coelho (Cell Signaling, Boston - MA). Os anticorpos secundários foram utilizados como descrito anteriormente.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos da guanosina sobre a crescimento celular

A análise da proliferação celular em células B16F10 tratadas com guanosina foi feita por 3 diferentes métodos: metabolização do MTT, coloração por cristal violeta e contagem em citômetro de fluxo. No primeiro, as células foram mantidas durante 3 horas na presença do composto MTT e então analisadas. O MTT é um composto amarelo solúvel que é metabolizado via mitocôndria, obtendo-se como produto final um composto púrpura insolúvel que precipita dentro da mitocôndria celular. Após o tempo decorrido de incubação com as células, estas foram lavadas com PBS e o precipitado formado é solubilizado com a adição de DMSO. Após a leitura da absorbância dos poços, foi feita uma correlação direta entre absorbância e proliferação celular; quanto mais células, mais mitocôndrias e mais produto metabolizado, gerando, portanto, uma intensidade de cor maior, com maior absorbância. Com esse experimento, nossos resultados demonstraram que a guanosina promovia a diminuição da proliferação celular (dados não mostrados), porém, como as células tratadas aparentavam apresentar menos grânulos por célula em relação ao controle, decidiu-se realizar o ensaio de proliferação por outro método. Além disso, este método foi eficiente na determinação da proliferação celular, porém, se a substância utilizada no tratamento de células interferir com o metabolismo mitocondrial, os dados não são plenamente confiáveis. O método escolhido para a análise da proliferação foi coloração com cristal violeta.

Após o tratamento das células com 1 mM de guanosina durante 24 ou 48 horas, estas foram fixadas e coradas com cristal violeta. O princípio de análise do método é o mesmo que do MTT: quanto mais células, maior coloração e consequentemente, maior a absorbância. Por este método, também observamos que as células tratadas com guanosina apresentavam um menor crescimento celular em relação às células controle (dados não mostrados). Uma dificuldade observada durante este método foi que quando estava procedendo-se a fixação das células, muitas vezes ocorria destas se soltarem da placa de cultivo e acabavam se perdendo durante o processo. Devido a essas condições, o método de contagem em

citometria de fluxo foi escolhido para a realização de uma curva de proliferação com diferentes concentrações de guanosina.

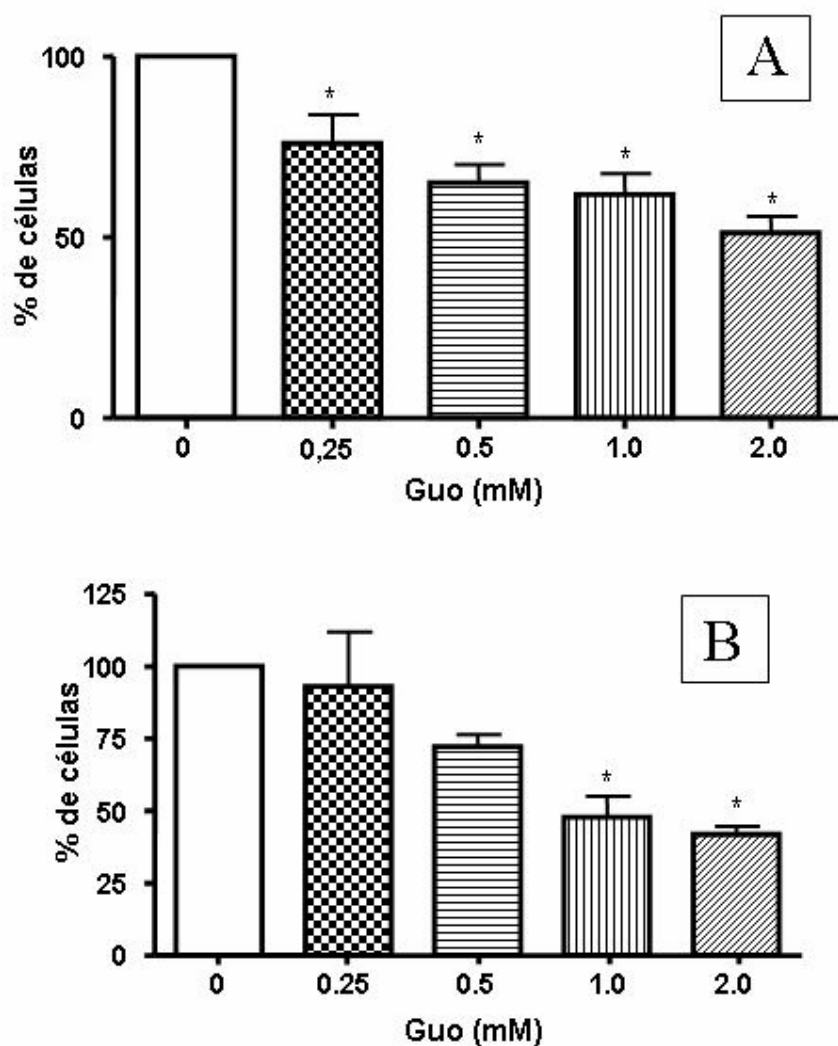


FIGURA 1. Guanosina induz diminuição da proliferação celular em células de melanoma murino B16F10. Células B16F10 mantidas com 0,1% de SFB foram tratadas com diversas concentrações de guanosina durante 24 (A) ou 48 (B) horas. Após este período, as células foram destacadas das placas de cultura com a mesma quantidade de PBS-EDTA e as amostras coletadas em quantidades iguais de meio RPMI. As células foram contadas em citômetro de fluxo (BD Facscalibur) durante 1 minuto, com fluxo constante. A porcentagem de células foi calculada em relação ao controle, que foi considerado como sendo 100%. $n = 3$; $p < 0,05$.

O tratamento de células de melanoma murino B16F10 pela droga guanosina induz uma diminuição na proliferação celular na linhagem estudada (figura 1). As células foram mantidas em presença da droga por 24 ou 48 horas e após estes períodos foram respectivamente soltas e ressuspensas em, um mesmo volume de

PBS-EDTA (200 μ l) e meio RPMI 1640 (500 μ l). As células foram então submetidas à citometria de fluxo para a realização da contagem celular. Esta contagem foi realizada em um tempo fixo determinado (1 minuto) e com fluxo constante, para que o volume analisado de cada amostra fosse igual, podendo-se então fazer uma correlação entre todas as amostras. O gráfico foi construído considerando-se o controle (veículo da guanosina – NaOH 0,5 M) como sendo 100% na contagem celular. Após 24 horas de tratamento das células com guanosina, todas as concentrações testadas da droga, em relação ao controle, promoveram uma inibição da proliferação celular, sendo esta inibição dependente da concentração (figura 1A). Quando os tratamentos foram mantidos por um período de 48 horas, a inibição da proliferação celular foi significativamente reforçada quando se utilizavam-se as concentrações de 1 e 2 mM de guanosina (figura 1B). Em 48 horas somente os tratamentos utilizando guanosina nas concentrações de 1 e 2 mM promoveram inibição da proliferação celular. Essa ausência em 48 horas do efeito observado em 24 horas sobre as condições de tratamento de 0,25 e 0,5 mM pode estar relacionado com a carência de soro a que as células foram submetidas. Como as células são mantidas por um longo período na presença de apenas 0,1% de soro fetal bovino (SFB), e este possui diversos fatores que são necessários para o crescimento normal das células, provavelmente, depois de 48 horas de tratamento, as células sofrem com a carência de soro, diminuindo também o crescimento das células controle. Entretanto, a inibição da proliferação induzida por 1 mM de guanosina é tão expressiva, que mesmo em 48 horas de tratamento, as células tratadas apresentam uma diminuição do crescimento significativa em relação às células controle.

O decréscimo observado na contagem do número celular nas diferentes concentrações e tempos de tratamentos com guanosina não é correlacionado com morte celular (tabela 1). Células B16F10 foram submetidas a tratamentos idênticos ao experimento de proliferação celular e após destacadas da placa de cultura, estas foram coradas com o corante vital azul de tripan e observadas, com auxílio de um hemocitômetro (Neubauer Improved), em microscópio de luz. As células do sobrenadante também foram analisadas. As células viáveis, como estão com sua membrana plasmática íntegra, não permitem a entrada do corante, enquanto que as células que possuem sua viabilidade comprometida coram-se de azul. Isso permite a análise e contabilização de células viáveis e não viáveis. As células tratadas possuem viabilidades muito semelhantes às células controle, possuindo ambas as

viabilidades em torno de 95%, indicando que a diminuição do número de células corresponde à parada de crescimento celular e não à morte por citotoxicidade da droga. Não houve diferença significativa no número de células no sobrenadante dos poços tratados e não tratados com guanosina.

Um ensaio utilizando anexina V e iodeto de propídio também foi realizado para analisar, respectivamente, a indução de apoptose e necrose pela guanosina (dados não mostrados). Este experimento demonstrou que a guanosina não induz apoptose nem necrose, confirmando a hipótese da droga tratar-se de uma substância citostática.

Diante dos resultados obtidos, foi escolhida uma concentração de guanosina para a realização das análises posteriores. A análise dos dados levou à escolha da concentração de 1 mM de guanosina, por esta ser a menor a apresentar inibição de proliferação nos dois tempos de tratamento utilizados. Todos os ensaios seguintes foram realizados com a concentração de 1 mM de guanosina.

TABELA 1. Guanosina não possui atividade citotóxica em células B16F10. Células B16F10 foram tratadas com 1 mM de guanosina ou volumes equivalentes de NaOH 0,5 M durante 24 ou 48 horas. As células foram então destacadas da placa de cultura e coradas com o corante vital azul de tripan. Os sobrenadantes dos poços também foram analisados. Todas as células foram contabilizadas e os dados foram expressos em porcentagem de células viáveis.

Tratamento	Período de Tratamento	
	24 h	48 h
Veículo	97,9	94,6
Guo	96,3	94,9

FONTE: O autor (2007)

NOTA: Viabilidade celular expressa em %.

5.2 Guanosina induz a diferenciação de B16F10

Durante o decorrer dos experimentos, além da diminuição da proliferação celular, pôde-se observar que havia uma mudança no fenótipo nas células tratadas com guanosina (figura 2). Células B16F10 foram tratadas com 1 mM de guanosina durante 24 ou 48 horas e então, após fixação, as células foram coradas com cristal violeta e fotografadas. Mudanças morfológicas puderam ser observadas nas células tratadas com guanosina durante 24 horas (figura 2C) e mais evidentemente após 48

horas (figura 2D) de tratamento em relação aos controles de 24 ou 48 horas (figuras 2A e 2B, respectivamente). As células submetidas ao tratamento passavam a apresentar uma organização das extensões dos prolongamentos celular predominantemente paralela, com a presença de grandes prolongamentos celulares, semelhantes a dendritos. Para análise dos dados, em cada célula, foi projetada uma barra do tamanho da maior extensão do corpo celular nos prolongamentos apresentados. As células que apresentavam os prolongamentos celulares maiores que três corpos celulares foram contabilizadas. Em relação ao controle, dentre as células tratadas, havia cerca de 2 vezes mais células com prolongamentos maiores que três corpos celulares (figura 3).

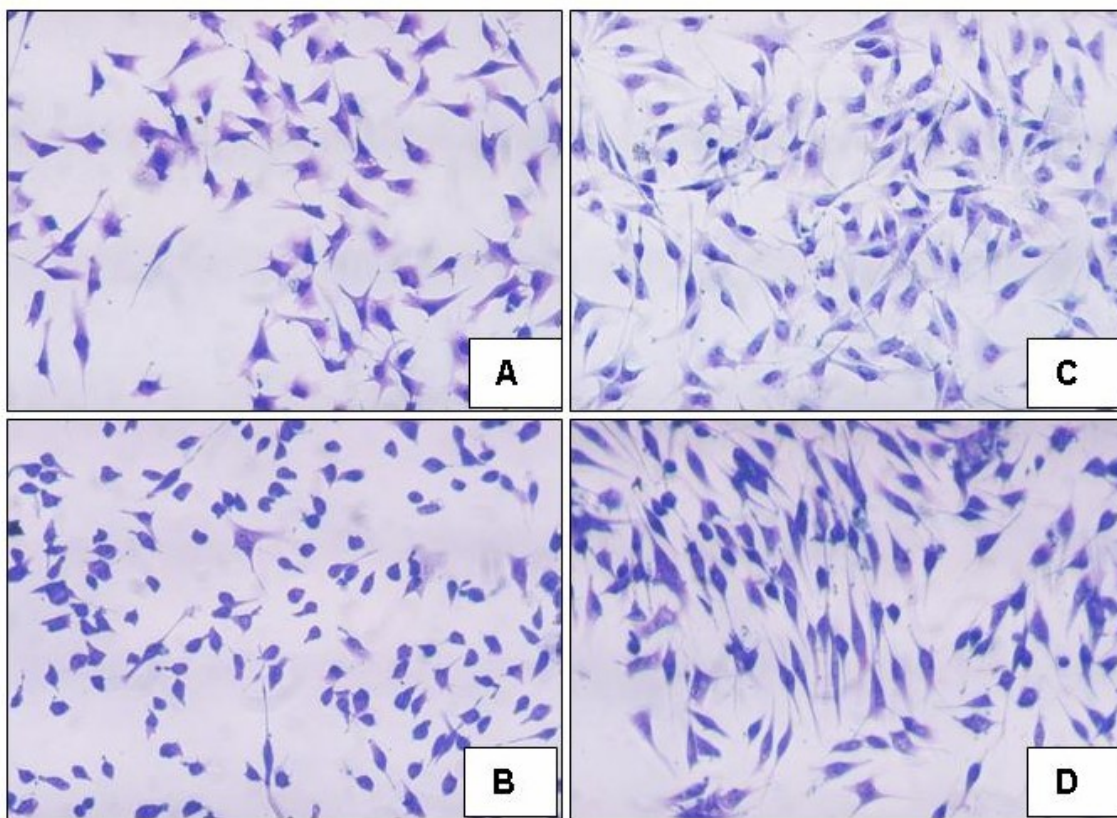


FIGURA 2. Guanosina induz alterações morfológicas em B16F10. Células B16F10 mantidas com 0,1% de SFB foram tratadas com 1 mM de guanosina durante 24 (C) ou 48 (D) horas e após fixação, coradas com cristal violeta. As células controle foram mantidas em presença de quantidades equivalentes de NaOH 0,5 M durante 24 (A) ou 48 (B) horas. As células foram fotografadas em um aumento de 100x. Resultado representativo de 3 experimentos.

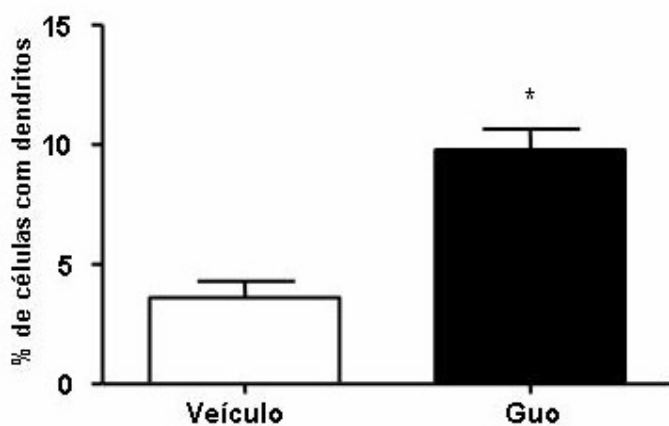


FIGURA 3. Número de células com prolongamentos maiores que três corpos celulares aumentam em células tratadas com guanosina. As células tratadas com 1 mM de guanosina ou quantidades equivalentes de NaOH 0,5 M foram fotografadas e analisadas quanto às extensões citoplasmáticas emitidas de cada célula após 48 horas de tratamento. Uma barra foi traçada sobre a maior extensão do corpo celular e esta foi projetada nos prolongamentos emitidos pela célula. As células que possuíam extensões citoplasmáticas maiores que o tamanho de três corpos celulares foram contabilizadas. Foram analisadas 250 células. $p < 0,05$.

Outro fator observado refere-se ao conteúdo de melanina presente nas células tratadas e não tratadas. Quando as células eram destacadas da placa de cultura e centrifugadas para que houvesse a formação de um precipitado de células, o precipitado das células tratadas com guanosina, em comparação com o precipitado das células controle, era muito mais escuro. Então, decidiu-se analisar o conteúdo de melanina nas células tratadas e não tratadas. Após o tratamento de células com 1 mM de guanosina durante 24 ou 48 horas, 5×10^5 células foram centrifugadas e ressuspensas em 500 μ l de NaOH 1 M. As amostras foram fervidas durante 1 hora e a absorbância de cada amostra foi lida, imediatamente após o resfriamento, em 490 nm (adaptado de ZHAO *et al.*, 2003; BUSCÀ *et al.*, 1996). Apesar do aumento da produção de melanina nas células tratadas ser visivelmente detectada, o método não foi eficiente em detectar essa alteração (dados não mostrados). Portanto, decidiu-se utilizar outro método para análise do conteúdo de melanina, a microscopia eletrônica de transmissão.

Para esta determinação, células tratadas ou não com 1 mM de guanosina durante 24 ou 48 horas foram centrifugadas. O precipitado formado foi fixado e embocado para posterior corte, coloração e análise em microscópio eletrônico de transmissão. Na figura 4 podemos observar que, após 48 horas, a quantidade de

grânulos de melanina nas células tratadas (fig 4B) é muito maior que na célula não tratada (fig 4A). Em destaque na figura 4B está a estrutura de um grânulo de melanina. O número de células que apresentou tais melanossomos também é significativamente maior quando tratado com guanosina durante 24 ou 48 horas, em relação ao controle (fig 4C).

Estes dois parâmetros analisados (mudanças na morfologia celular e aumento no conteúdo de melanina) indicam a ocorrência de um processo de diferenciação (ZHAO *et al.*, 2003) na linhagem celular estudada induzida por guanosina.

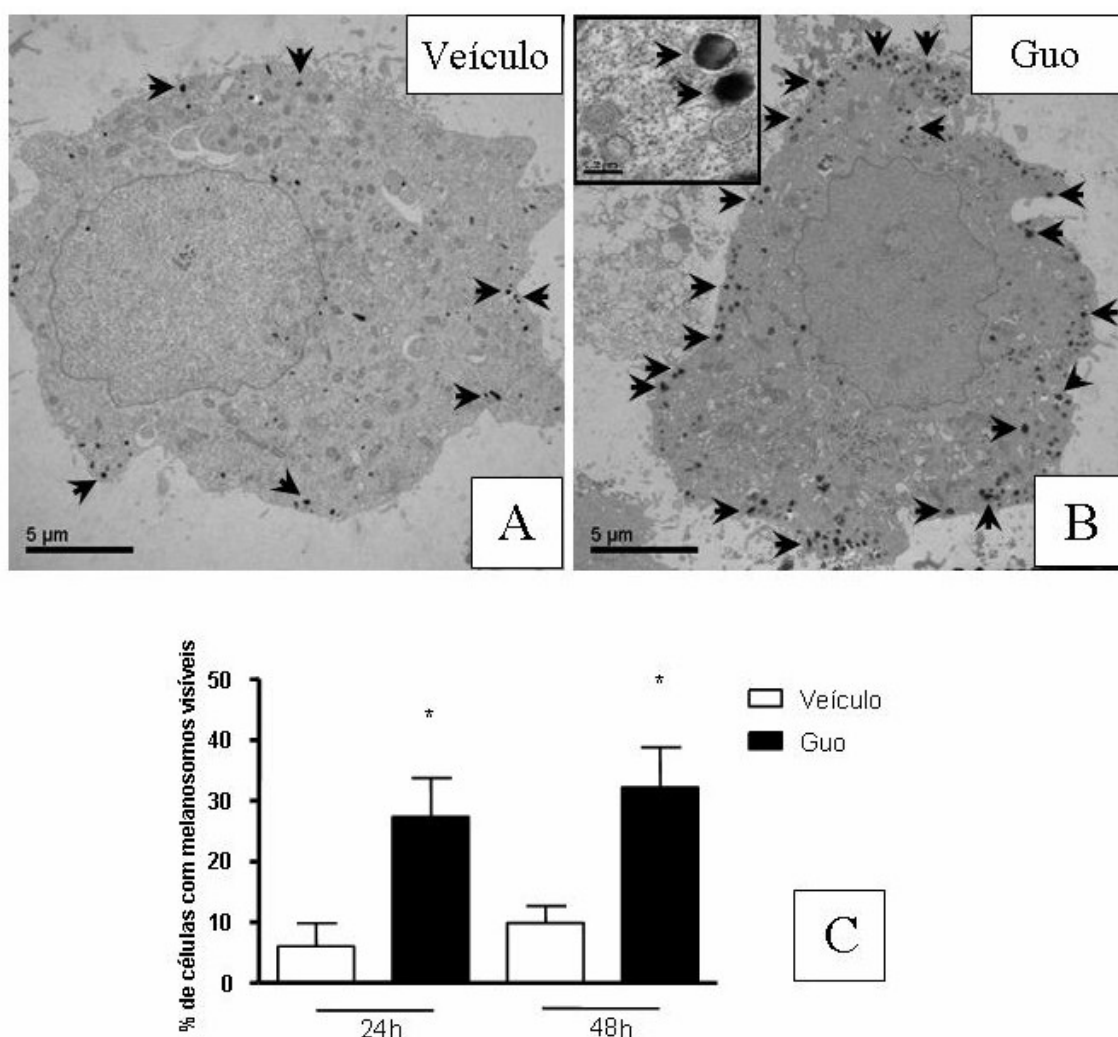


FIGURA 4. Guanósina aumenta a síntese de melanina. Células B16F10 tratadas com 1 mM de guanósina ou quantidades equivalentes de NaOH 0,5 M foram preparadas para análise em microscópio eletrônico. Em (A), eletro micrografia representativa de células controle mantidas durante 48 horas em presença do veículo; (B), eletro micrografia representativa de células tratadas com guanósina durante 48 horas; (C), quantificação de células com melanossomos. $n = 3$; $p < 0,05$.

5.3 Guanosina diminui a migração de B16F10

Considerando que o tratamento com guanosina estava induzindo uma diferenciação na célula B16F10, decidiu-se analisar mais um fator que pudesse levar à confirmação de que esta célula estaria sofrendo uma diferenciação para um estado menos agressivo do tumor. As células tratadas com guanosina possuem uma capacidade migratória menor quando comparadas com as células controle (figura 5). Células B16F10 foram plaqueadas a uma densidade determinada para que houvesse aproximadamente 100% de confluência na placa de cultivo. Após a adesão celular, uma linha de células foi destacada da placa com o auxílio de uma ponteira de micropipeta do tipo p-200. As células foram então lavadas e tratadas com 1 mM de guanosina ou veículo (controle). Para análise dos resultados, traçou-se uma linha que determinava a região onde as células foram retiradas e as células que migraram para este campo foram contabilizadas. Conforme as células são mantidas em presença da guanosina, há uma diminuição do número de células que migram em relação ao controle. Doze horas após o tratamento, já ocorre uma diminuição significativa no número de células que migraram. Após 24 horas de tratamento, há uma diminuição de aproximadamente 70% na migração de células tratadas em relação às não tratadas (figura 5). Apesar de a droga utilizada provocar uma diminuição da proliferação celular, o fato de haver menos células migrando deve ser considerado, pois a inibição da migração (aproximadamente 80% em 48 horas de tratamento – figura 5) é maior do que a inibição da proliferação (aproximadamente 55% em 48 horas de tratamento – figura 1B, concentração de 1 mM de guanosina).

Para confirmar que o tratamento de células B16F10 com guanosina induzia uma diminuição da proliferação celular independentemente da diminuição da proliferação celular foi realizado um ensaio de migração celular através da utilização da câmara de Boyden. Células B16F10 foram tratadas com 1 mM de guanosina ou volumes equivalentes do seu veículo durante 24 h. Após este período, as células foram soltas com tripsina e ressuspensas em meio RPMI 1640 contendo 0,1% de SFB. $1,8 \times 10^5$ células (em 200 μ l de meio) foram plaqueadas em câmara de Boyden e incubadas durante 3 h em estufa a 37° C e 5% de CO₂. Como quimioatratante, foi utilizado meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB. As células foram então fixadas

com metanol 100% e coradas com cristal violeta. Os poços foram lavados, fotografados e as células que migraram foram contabilizadas. O experimento demonstrou que a guanosina promove uma inibição da migração em células B16F10 (figura 6).

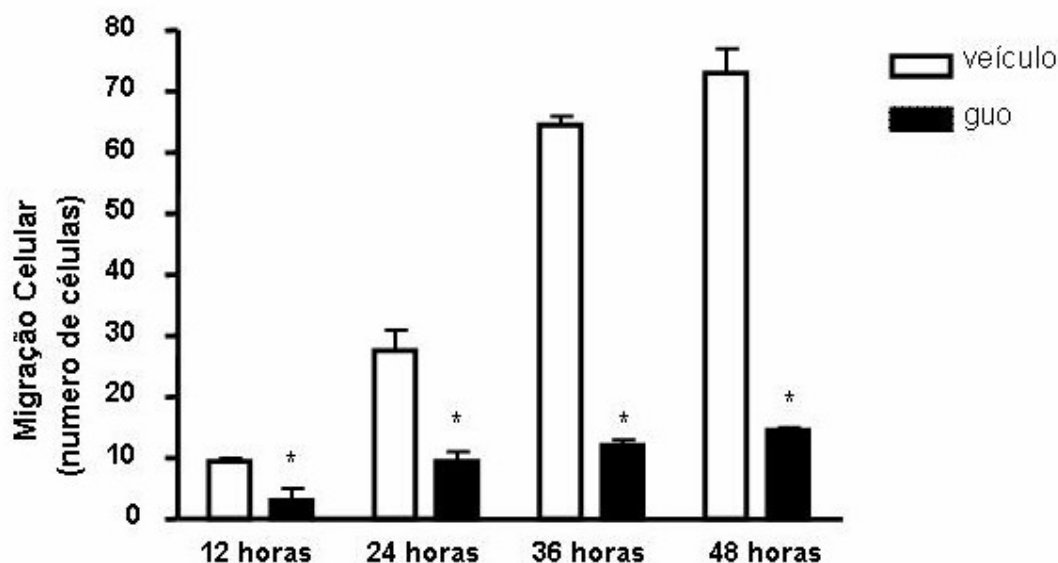


FIGURA 5. Guanosina inibe a migração celular. Em placas confluentes de B16F10 foi retirada uma linha de células com auxílio de uma ponteira de micropipeta do tipo P200. As células foram tratadas com 1 mM de guanosina ou quantidades equivalentes de NaOH 0,5 M e analisadas durante 48 horas. As células foram fotografadas nos tempos zero, 12, 24, 36 e 48 horas. Uma linha foi traçada no espaço vazio no tempo zero dos tratamentos e as células que migraram para este espaço foram contabilizadas. $n = 3$; $p < 0,05$.

Diante dos fatos que demonstraram que o tratamento de células de melanoma murino B16F10 com a concentração de 1 mM da droga guanosina direcionavam estas células a uma diferenciação celular, decidiu-se investigar os mecanismos pelos quais a guanosina estava induzindo esta diferenciação. Já é conhecido na literatura que há um envolvimento da via de sinalização da MAP kinase em processos de proliferação, diferenciação e apoptose (KONDOH *et al.*, 2005). Também já está descrito o envolvimento da proteína ERK 1/2 em processos de diferenciação envolvendo outras linhagens celulares (ENGLARO *et al.*, 1995). Com base nesses conhecimentos, procedeu-se então a investigação de prováveis moléculas envolvidas na diferenciação observada. Dentre essas moléculas, a ERK

1/2 foi uma das proteínas investigada, a qual se mostrou importante neste processo (figura 7).

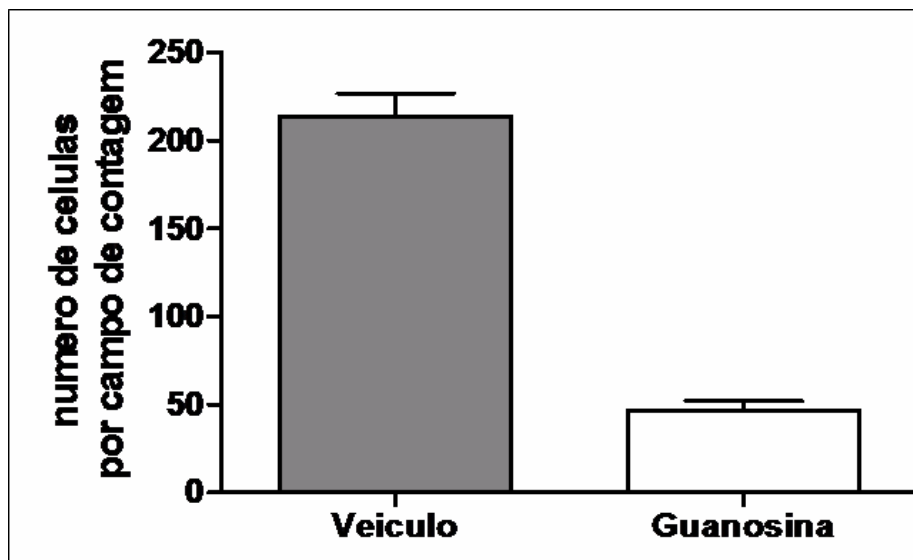


FIGURA 6. Inibição da migração celular induzida por guanosina é independente da proliferação celular. Células B16F10 foram tratadas com 1 mM de guanosina ou volumes equivalentes do seu veículo durante 24 h. Após este período, as células foram soltas com tripsina e ressuspensas em meio RPMI 1640 contendo 0,1% de SFB. $1,8 \times 10^5$ células (em 200 μ l de meio) foram plaqueadas em câmara de Boyden e incubadas durante 3 h em estufa a 37° C e 5% de CO₂. Como quimioatratante, foi utilizado meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB. As células foram então fixadas com metanol 100% e coradas com cristal violeta. $p < 0,05$.

5.4 Ativação da ERK 1/2 e da PKC contribuem para a diferenciação de B16F10

Extratos de células que foram submetidas a diferentes tempos de tratamento com 1 mM de guanosina foram separados em SDS-PAGE e eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após bloqueio da membrana com uma proteína inerte ao ensaio, esta foi incubada durante 16 horas a 4° C, sob agitação constante, com o anticorpo primário anti-fosfo ERK 1/2. Um anticorpo secundário ligado à enzima peroxidase foi utilizado para possibilitar a visualização da reação. Como podemos observar na figura 7A (sendo V = veículo e G = guanosina), há um aumento na fosforilação da proteína ERK 1/2 quando as células são tratadas com guanosina, em relação ao controle. Este aumento da fosforilação é significativo a

partir de 15 minutos de tratamento com a guanosina (fig 7C). A proteína mantém-se ativa até 120 minutos decorrentes do tratamento com a droga.

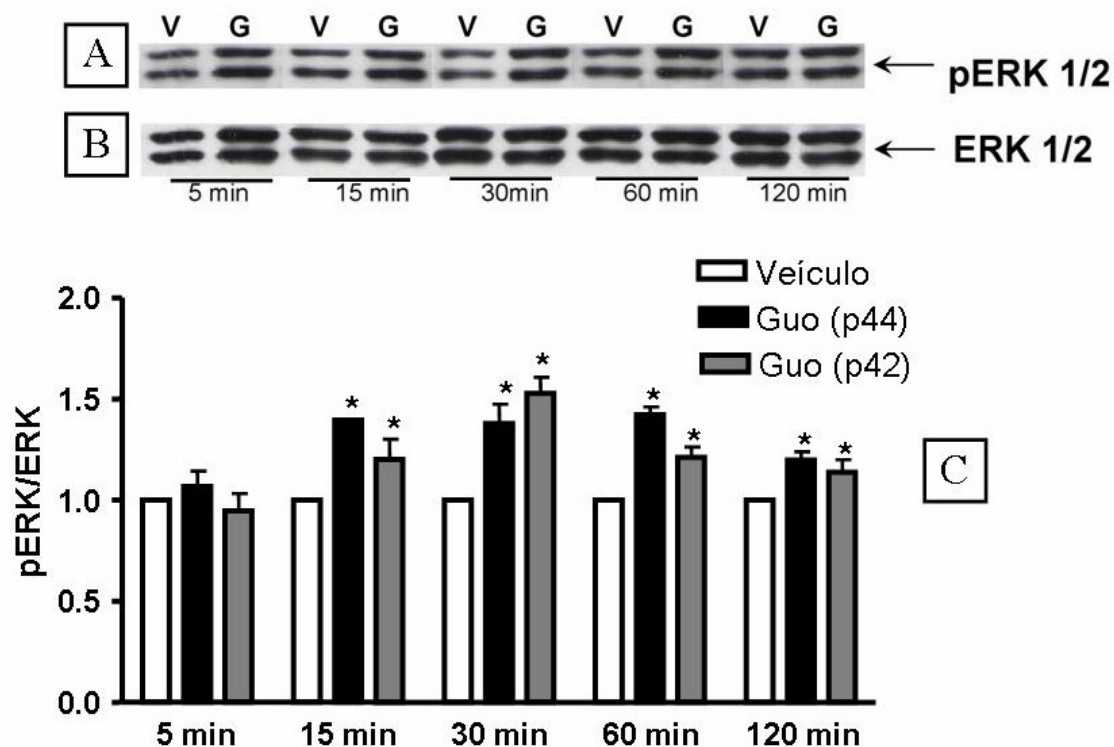


FIGURA 7. Ativação da ERK 1/2 em B16F10 tratadas com guanosina. Células B16F10 tratadas por curtos períodos de tempo (5, 15, 30, 60 e 120 minutos) com 1 mM de guanosina ou quantidades equivalentes do veículo foram lisadas e as proteínas separadas em SDS-PAGE. As proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose e reagidas com o anticorpo anti-fosfo-ERK 1/2 (A). Após desligamento dos anticorpos da membrana por adição de NaOH 1 M durante 3 minutos, a membrana foi novamente reagida com anti-ERK 1/2 (B). Em A e B, WB representativo de três experimentos independentes. Após densitometria das bandas, um índice entre ERK fosforilada e ERK total foi calculado e analisado em relação às células controle (C). n = 3; p < 0,05.

Para confirmar a participação da ERK 1/2 no processo de diferenciação da célula B16F10 induzida por guanosina, foi utilizado um inibidor específico da ERK 1/2, o peptídeo 1 (KELEMEN *et al.*, 2002). As células foram previamente incubadas com o inibidor e mantidas em presença da guanosina por 24 horas. Após este período, as células foram analisadas quanto a sua morfologia, como descrito anteriormente na figura 3. Quando tratadas com guanosina, as células apresentaram

alterações morfológicas evidentes (figuras 2, 3 e 8). Já em presença do inibidor, as células tratadas com guanosina não apresentam as alterações morfológicas (figura 8) citadas anteriormente, demonstrando, portanto, que o processo de diferenciação da célula B16F10 está relacionado com a fosforilação e consequentemente, ativação da proteína ERK 1/2. Bloqueando-se a fosforilação desta proteína, bloqueia-se também os efeitos morfológicos visualizados na célula (figura 8). Por ser o solvente do inibidor utilizado, DMSO foi utilizado como controle negativo da inibição da mudança morfológica induzida por guanosina em células B16F10.

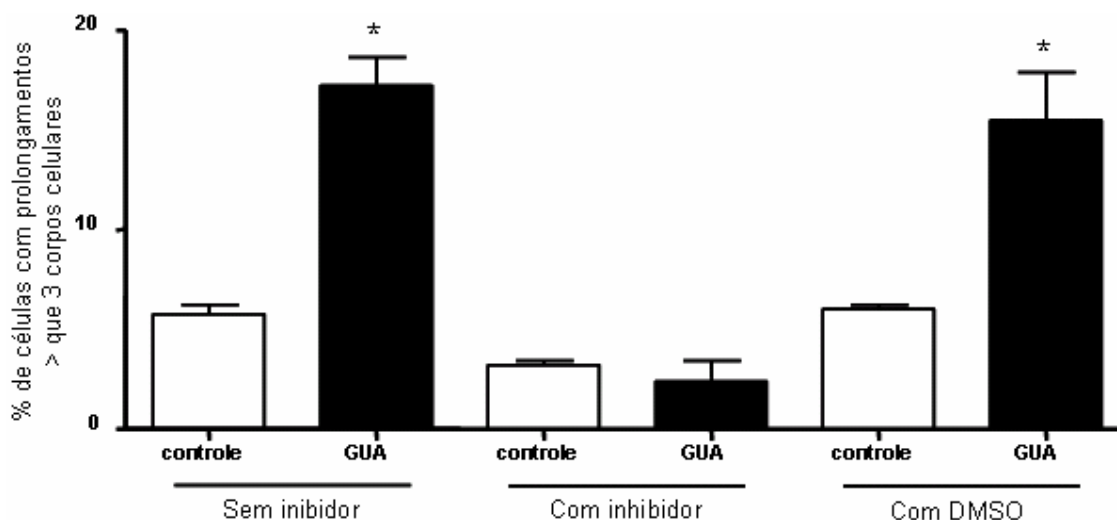


FIGURA 8. Bloqueio da ativação da ERK 1/2 bloqueia mudanças morfológicas induzidas por guanosina. Células B16F10 foram previamente incubadas com o inibidor específico da ERK peptide 1 durante 30 minutos. Após este período, as células foram tratadas com 1 mM de guanosina ou quantidades equivalentes de NaOH 0,5 M por 24 horas. O tratamento também foi realizado nas mesmas condições de concentração e tempo sem o inibidor ou na presença de DMSO, sendo este o solvente do inibidor. As células que possuíam extensões citoplasmáticas maiores que três corpos celulares foram contabilizadas e analisadas. n = 3; p < 0,05.

A produção de melanina também é influenciada pela ativação da proteína ERK (figura 9). Células previamente tratadas com o inibidor da ERK, peptídeo 1, e mantidas em presença de 1 mM de guanosina durante 48 horas apresentam menor síntese de melanina que as células não incubadas com o inibidor. A coloração do precipitado formado quando as células são incubadas somente com guanosina é muito mais escura que quando incubada somente com o veículo da droga ou com o inibidor da ERK mais a guanosina, indicando, portanto, que há um bloqueio da produção de melanina quando a ativação da ERK é bloqueada (figura 9). Este

resultado indica a participação da ativação da ERK na melanogênese induzida por guanosina.



FIGURA 9. Ativação da ERK 1/2 está envolvida no aumento da síntese de melanina induzida por guanosina. Células B16F10 tratadas com 1mM de guanosina ou quantidades equivalentes de NaOH 0,5M durante 48 horas foram destacadas da placa de cultura e centrifugadas até a formação de um precipitado. Uma amostra foi previamente tratada durante 30 minutos com um inibidor específico da ERK, peptídeo 1, antes do tratamento com guanosina. Os precipitados de células formados após centrifugação foram fotografados.

Como existem dados na literatura demonstrando que a diferenciação de melanoma resulta do aumento do cAMP intracelular (ENGLARO *et al.*, 1995), decidimos investigar se a diferenciação observada na linhagem estudada também estava relacionada com aumento de cAMP intracelular. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas com guanosina durante diversos tempos de tratamento. Em nenhum dos tempos analisados foi observado aumento da concentração do AMP cíclico intracelular (figura 10), demonstrando que esta molécula sinalizadora não está envolvida no processo de diferenciação de células B16F10 mediado por guanosina. Forskolina (10 μ M), um agente diferenciador de melanoma dependente de cAMP, foi utilizado como controle positivo e promoveu um aumento de 120 vezes nos níveis intracelular de cAMP. Portanto, outras vias relacionadas à ERK 1/2 foram analisadas.

Outra proteína investigada quanto à sua ativação foi a Akt. Proteínas em extratos de células tratadas durante 15 minutos com 1 mM de guanosina ou volumes equivalentes de NaOH 0,5 M foram separados eletroforeticamente e reagido após eletrotransferência para membrana de nitrocelulose com o anticorpo anti-fosfo Akt. Dez μ M de forskolina foram utilizados como controle positivo da ativação da Akt e o inibidor da Akt LY294002 foi utilizado como controle negativo da reação. A via PI3K/Akt é conhecida como promotora de sinalização de sobrevivência celular, tendo

um importante papel na progressão do ciclo celular (CHANG *et al.*, 2003) e não está envolvida no processo de diferenciação de células B16F10 induzido por guanosina (figura 11). As células não apresentam a Akt ativada em B16F10 tratadas com guanosina, indicando, portanto, que esta proteína não está envolvida nas alterações celulares promovidas pela guanosina.

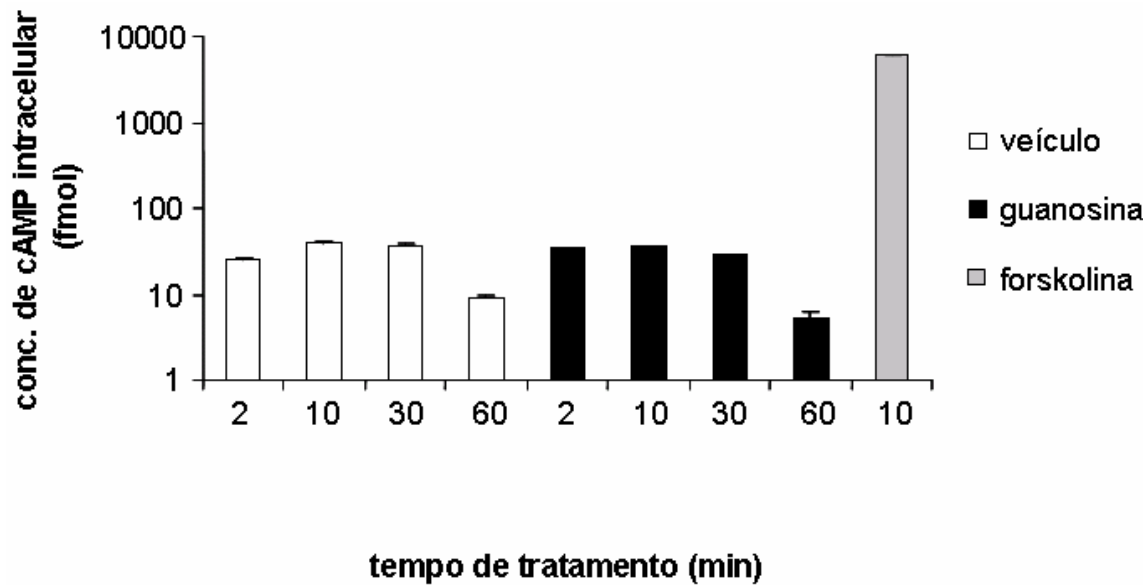


FIGURA 10. Diferenciação de B16F10 induzida por guanosina ocorre por mecanismos independentes do aumento da concentração intracelular de cAMP. Células B16F10 tratadas com 1 mM de guanosina ou quantidades equivalentes do veículo durante 2, 10, 30 ou 60 minutos foram lisadas e a concentração de cAMP intracelular (fmol) foi analisada por ELISA de competição de antígeno. n = 3; p < 0,05.

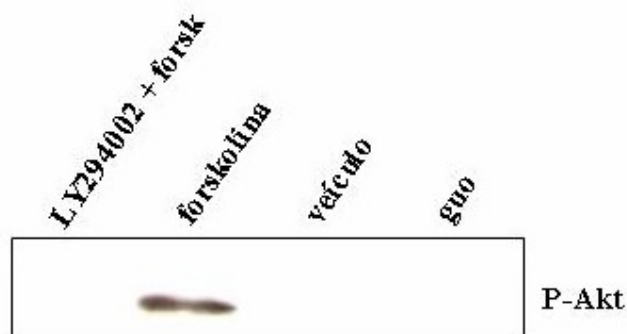


FIGURA 11. Akt não está ativada em células tratadas com guanosina. Células B16F10 foram tratadas com 1 mM de guanosina ou quantidades equivalentes de NaOH 0,5M durante 15 minutos e então lisadas. Após separação eletroforética e eletrotransferência das proteínas celulares para uma membrana de nitrocelulose, a membrana foi reagida com anticorpo anti-fosfo-Akt. Dez μ M de forskolina foi utilizada como controle positivo da ativação da Akt e o inibidor da Akt LY294002 foi utilizado como controle negativo da reação.

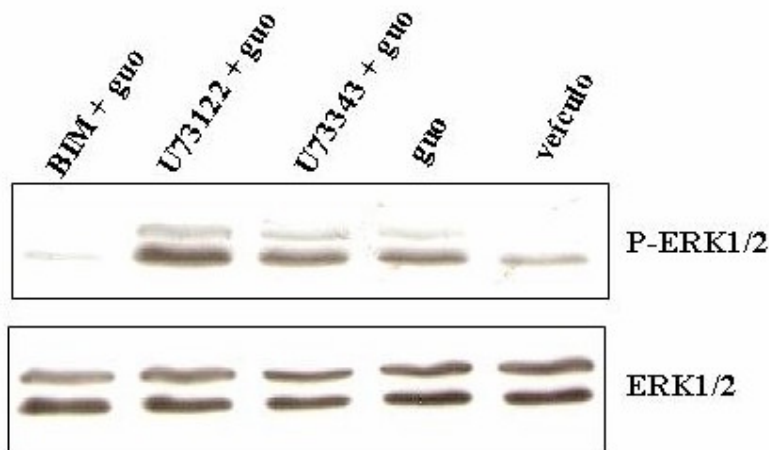


FIGURA 12. Bloqueio da PKC inibe a fosforilação da ERK 1/2 induzida por guanosina. Células B16F10 foram previamente tratadas com inibidores da PKC (BIM) e PLC (U73122) e então tratadas com 1 mM de guanosina ou quantidades equivalentes do seu veículo durante 30 minutos. O composto U73343 foi utilizado como controle negativo do bloqueio da PLC. Após lise celular, quantidades iguais de proteínas foram resolvidas em gel de poliacrilamida e eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose. Esta membrana foi reagida com o anticorpo anti-fosfo-ERK 1/2 e após desligamento destes anticorpos, novamente reagida com o anticorpo anti-ERK 1/2.

Também foram investigadas as proteínas PKC (proteína quinase C) e PLC (fosfolipase C). As células foram previamente incubadas com um inibidor específico para PKC (BIM – Bis indol maleimida) e PLC (U73122), e então tratadas com 1 mM de guanosina durante 30 minutos. O composto U73343 foi utilizado como controle da ativação da PLC, por ser um análogo do inibidor desta proteína, porém, sem atividade. Após o período de tratamento, foi realizado um extrato celular, conforme descrito anteriormente, e as proteínas foram separadas por eletroforese. Após transferência para uma membrana de nitrocelulose, foi realizado um Western Blot utilizando como anticorpo primário anti-fosfo-ERK 1/2. A figura 12 mostra que quando as células são mantidas em presença do inibidor da PKC, o aumento da fosforilação observado anteriormente na proteína ERK 1/2 quando tratado somente com guanosina não ocorre. Bloqueando-se a ativação da PKC, a ativação da ERK 1/2 também é bloqueada, demonstrando uma relação entre a ativação das duas proteínas quando células B16F10 são tratadas com 1 mM de guanosina. Porém, quando foi utilizado um inibidor para a PLC, não foi observado diminuição da ativação da ERK 1/2 em células tratadas, demonstrando que a PLC provavelmente não está envolvida no processo de diferenciação de células B16F10 induzida por guanosina.

6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados demonstraram que a guanosina promove efeitos em células de melanoma B16F10, como parada de crescimento celular, arranjo celular predominantemente paralelo, extensão de prolongamentos celulares, aumento da melanogênese e diminuição da migração celular.

A diminuição do número de células observada nos tratamentos de B16F10 com guanosina não está correlacionada com morte celular, permitindo afirmar que a droga utilizada induz a uma diminuição do crescimento celular, sem causar citotoxicidade. Uma inibição de proliferação celular induzida por guanosina também foi demonstrada em células bacterianas de *Escherichia coli* (PETERSEN, 1998). O aumento da concentração de guanosina nestas bactérias promove uma inibição do crescimento celular em células de *Escherichia coli* com uma mutação no gene *gsk-3*, um gene estrutural da guanosina quinase, induzindo então um aumento na concentração intracelular de guanosina, o que promove uma parada do crescimento bacteriano (PETERSEN, 1998). Entretanto, efeitos similares aos efeitos morfológicos apresentados no tratamento de células B16F10 com guanosina foram observados em células eucarióticas PC12 tratadas com guanosina e estes resultados são consequência de uma ação extracelular da droga (GYSBERS *et al.*, 1995). Os efeitos observados não são alterados quando é realizado um bloqueio do transporte de nucleosídeos para o meio intracelular, indicando, portanto, que a guanosina age extracelularmente em células PC12. Esta ação é também independente de receptores clássicos de nucleosídeos purínicos do tipo A1 ou A2, possuindo, portanto, a guanosina um mecanismo distinto de ação (GYSBERS *et al.*, 1995).

Além da diminuição da proliferação celular, o tratamento com guanosina também induz mudanças morfológicas em células B16F10. Alterações morfológicas semelhantes foram observadas em B16F10 tratadas com acetato ácido bosvético (ZHAO *et al.*, 2002). Este composto promove a diferenciação de células B16F10, que apresentam extensões celulares semelhantes a dendritos após 24 horas de tratamento (ZHAO *et al.*, 2002). A modificação na morfologia celular induzida por guanosina é caracterizada por apresentar extensões citoplasmáticas longas, semelhantes a dendritos, e pelo arranjo dessas extensões encontrarem-se preferencialmente em paralelo. Essa mudança morfológica é um dos pontos

observados como marcadores quando ocorre uma diferenciação em células de melanoma (ENGLARO *et al.*, 1998; ZHAO *et al.*, 2002; SCOTT *et al.*, 2003).

Outro fator modulado pela presença de guanosina em cultura de células B16F10 é a produção de melanina. O aumento da síntese de melanina pode ser induzida pela ativação da proteína ERK 1/2 e o aumento do cAMP intracelular (ENGLARO *et al.*, 1995) e pode estar correlacionada com processos de diferenciação celular em melanomas (ENGLARO *et al.*, 1995; BUSCÀ *et al.*, 1996; ZHAO *et al.*, 2002). Estes dados corroboram os nossos dados obtidos, indicando a diferenciação da célula B16F10 quando em presença de guanosina, pois esta célula passa a apresentar um aumento significativo na produção de grânulos de melanina, indicando que está ocorrendo um processo de diferenciação celular. Por outro lado, dados da literatura demonstram que a ativação da via da MAP quinase não é necessária no aumento da melanogênese induzida por forskolina em B16F10 e que essa ativação provoca ainda uma inibição da diferenciação celular (ENGLARO *et al.*, 1998).

A proteína quinase C (PKC) também está envolvida em processos de estimulação da melanogênese (PARK *et al.*, 1993; PARK *et al.*, 1996). A síntese de melanina induzida por MSH (hormônio estimulador de melanócito) é bloqueada quando uma depleção da PKC é realizada (PARK *et al.*, 1996; SMALLEY *et al.*, 2000) e dados da literatura demonstram que a isoforma β da PKC é capaz de estimular a melanogênese em melanomas e melanócitos (PARK *et al.*, 1993). Em células B16F10 o bloqueio da PKC inibe a ativação da ERK 1/2 induzida por guanosina, sugerindo fortemente o envolvimento da PKC na melanogênese, pois quando bloqueado a fosforilação da ERK, a síntese de melanina diminui significativamente. A PKC tem sido reportada como ativador da ERK 1/2 em processos de diferenciação celular, corroborando nossos resultados (PUENTE *et al.*, 2000).

Dados da literatura demonstram que a melanogênese pode ser induzida em células de melanoma B-16 por ativação da ERK pelo aumento intracelular do segundo mensageiro cAMP (ENGLARO *et al.*, 1995). Em células PC-12, a formação de dendritos induzida por guanosina pode ocorrer de maneira dependente e independente de cAMP (GYSBERS *et al.*, 1996). Estes dados sugerem que o cAMP possui um papel importante na produção de melanina e formação de prolongamentos celulares em determinadas células, porém nossos resultados

demonstram que a diferenciação de células B16F10 induzida por guanosina, com aumento da melanogênese e prolongamentos celulares, é independente do aumento da concentração de cAMP.

O aumento da produção de melanina também pode ocorrer pela ativação da proteína quinase C (PKC). Estudos demonstram que a depleção da PKC- β e sua super expressão induzem, respectivamente, um bloqueio da produção de melanina induzida por α -MSH em células de melanoma S19 (PARK *et al.*, 1996) e um aumento na melanogênese em células transfectadas com cDNA PKC- β (PARK *et al.*, 1993). Estes dados corroboram o aumento da melanogênese observada em B16F10 tratadas com guanosina, onde ocorre um aumento da ativação da proteína ERK dependente da ativação da PKC e a inibição da fosforilação da ERK bloqueia a produção de melanina induzida por guanosina.

A guanosina é capaz de promover uma diminuição da migração celular em relação às células controle e também apresenta a capacidade de diminuir a expressão e/ou atividade metaloprotease das células B16F10 (dados não mostrados), indicando uma diferenciação do melanoma para uma forma menos agressiva do tumor. Dados semelhantes foram mostrados por Zhao *et al.* (2003), onde um composto, o acetato ácido bosvélico induz em B16F10 uma inibição da migração celular e diminuição da atividade metaloprotease, indicando uma diferenciação celular. A atividade metaloprotease está envolvida em células tumorais com invasão, angiogênese e metástase (Chang *et al.*, 2001), levando a inferência de que se esta atividade é diminuída pelo tratamento de células B16F10 com guanosina, as células tratadas são menos agressivas em relação às células controle. Pela migração ser um importante processo envolvido em metástases tumorais (EDIN *et al.*, 2001), a diminuição da migração induzida por guanosina é mais um fator que evidencia a diferenciação das células B16F10 a uma forma menos agressiva. Além destes efeitos, como o ocorrido com células B16F10 tratadas com guanosina, o composto acetato ácido bosvélico também apresenta uma parada do crescimento celular e mudanças morfológicas em células tratadas (ZHAO *et al.*, 2003), reforçando a hipótese de re-diferenciação celular para uma forma menos agressiva.

Várias proteínas envolvidas em sinalização podem direcionar a uma diferenciação celular. Dentre elas, a via da p38, a via da ERK e a via da JNK (revisado por ZHANG *et al.*, 2002). É amplamente conhecido que a ativação da

proteína ERK 1/2 pode estar envolvida com processos de diferenciação celular (revisado por SCHAEFFER *et al.*, 1999; CHANG *et al.*, 2002; KONDOH *et al.*, 2005; NISHIMOTO *et al.*, 2006). Entretanto, dados da literatura demonstram que a ativação da ERK1/2 em células B16F10 tratadas com forskolina inibe a diferenciação celular (ENGLARO *et al.*, 1998). Porém, as vias de sinalização envolvidas nos processos de diferenciação induzidos por forskolina e guanosina são diferentes. Foi demonstrado que a forskolina promove um aumento do cAMP intracelular (ENGLARO *et al.*, 1995; BUSCÀ *et al.*, 1996), enquanto que a guanosina não promove este efeito, indicando, portanto, que o processo de diferenciação nos diferentes tratamentos citados ocorrem de maneira distinta para guanosina e forskolina. Os efeitos sobre a morfologia celular também são diferentes entre forskolina e guanosina. A guanosina promove um aumento de prolongamentos celulares em pequeno número, geralmente dois, enquanto que a forskolina promove a emissão de numerosos e arborescentes dendritos (ENGLARO *et al.*, 1995).

De acordo com os resultados apresentados, a ERK 1/2 está envolvida com a diferenciação de células B16F10 induzida por guanosina. Dados da literatura sugerem que em células PC-12, a ativação da ERK1/2 por várias horas leva ao evento celular de diferenciação, enquanto que a fosforilação com curto tempo de duração direciona à proliferação celular (revisado por MARSHALL, 1995). A fosforilação sustentada da ERK 1/2 (durante 120 minutos) direciona a ocorrência da diferenciação celular observada em nosso estudo, sendo responsável pela indução da formação de prolongamentos celulares semelhantes a dendritos e melanogênese. Esses eventos são independentes do aumento intracelular de cAMP e surpreendentemente independentes da ativação da fosfolipase C (PLC), porém, envolvidos com a ativação da proteína quinase C (PKC). Portanto, a guanosina promove uma diferenciação de células B16F10 através da via PKC-ERK 1/2 e independente de cAMP e PLC, diferindo de outras substâncias que promovem a diferenciação celular através do aumento do cAMP intracelular, como a forskolina (ENGLARO *et al.*, 1995; BUSCÀ *et al.*, 1996) e α -MSH (ENGLARO *et al.*, 1995; PARK *et al.*, 1996; WATTERS *et al.*, 1999; SMALEY *et al.*, 2000).

Estudos recentes demonstraram a ligação de guanosina em sítios específicos em membranas de cérebro de ratos (TRAVERSA *et al.*, 2002) e a proposta de um receptor de guanosina acoplado à proteína G (TRAVERSA *et al.*, 2003). Entretanto, como em nosso estudo não ocorre a ativação da PLC nem aumento do cAMP em

células tratadas, a sinalização desencadeada pela guanosina não deve estar envolvida com a ligação a um receptor acoplado à proteína G. Porém, como existem estudos que demonstram que a guanosina age extracelularmente em células PC12 (GYSBERS *et al.*, 1995), provavelmente também há uma ação extracelular da guanosina em células B16F10, podendo esta ação ocorrer através de receptores de tirosina quinase.

A guanosina, além de promover uma parada do crescimento celular, induz alterações celulares, como produção de melanina e diminuição da migração celular, que inferem a uma diferenciação para uma forma menos metastático do melanoma. Entretanto, o tratamento *in vitro* com guanosina mostra-se apenas citostático e não citotóxico, como se esperaria de um agente quimioterápico ideal para o tratamento de tumores, impossibilitando seu uso como tal. Porém, pelas suas propriedades demonstradas de agente antiproliferativo e indutor de diferenciação em melanoma B16F10, a guanosina pode ser usada em conjunto com menores doses de outras drogas quimioterapêuticas convencionais, o que já vem sendo testado em animais experimentais (IIGO *et al.*, 1984; IIGO *et al.*, 1987; KIM *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2007).

CONCLUSÕES

Os experimentos realizados no presente estudo levam às seguintes conclusões:

- ✓ O tratamento de células de melanoma murino B16F10 com 1 mM de guanosina durante 24 ou 48 horas promove uma diminuição na proliferação celular, acompanhado de mudanças morfológicas drásticas nas células tratadas em relação ao controle;
- ✓ A guanosina aumenta a produção de melanina em 24 horas de tratamento e diminui a migração celular significativamente a partir de 12 horas em contato com a droga, em relação ao controle;
- ✓ A proteína ERK1/2 encontra-se ativada após 15 minutos de tratamento com a guanosina e mantém essa ativação sustentada até 120 minutos depois;
- ✓ A emissão de prolongamentos celulares semelhantes a dendritos e a indução da melanogênese são dependentes da ativação da ERK1/2;
- ✓ A ativação da ERK1/2 ocorre por via independente de cAMP e dependente de PKC;
- ✓ Surpreendentemente, a PLC não está envolvida na ativação da ERK mediada pela PKC e induzida por guanosina;
- ✓ Em células de melanoma murino B16F10 tratadas com guanosina ocorre uma diferenciação celular, para uma forma possivelmente menos agressiva do tumor, induzida pela ativação das proteínas PKC e ERK1/2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, C.M.; BUZAID, A.C.; LEGHA, S.S. Systemic treatment for advanced cutaneous melanoma. **Oncol.**, v. 9, p. 1149-1158, 1995.

BALDI, A.; SANTINI, D.; DE LUCCA, A.; PAGGI, M.G. cDNA array technology in melanoma: an overview. **J. Cell. Physiol.**, v. 196, p. 219-223, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BULLANI, R.R.; HUARD, B.; VIA 'd-LEYEUGLE, I.; BYERS, H.R.; IRMLE' M.; SAURAT, J.H. Selective expression of FLIP in malignant melanocytic skin lesions. **J. Invest. Dermatol.**, v. 117, p. 360-4, 2001.

BUSCÀ, R.; BERTOLOTTO, C.; ORTONNE, J.P.; BALLOTTI, R. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/p70S6-kinase pathway induces B16 melanoma cell differentiation. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 31824-31830, 1996.

CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends Cell Biol.**, v. 11, p. S37-S43, 2001.

CHANG, F.; STEELMAN, L.S.; SHELTON, J.G.; LEE, J.T.; NAVOLANIC, P.M.; BLALOCK, W.L.; FRANKLIN, R.; McCUBREY, J.A. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway. **Int. J. Oncol.**, v. 22, p. 469-480, 2003.

CHIN, L.; GARRAWAY, A.L.; FISHER, D.E. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. **Genes Dev.**, v. 20, p. 2149-2182, 2006.

EDIN, M.L.; HOWE, A.K.; JULIANO, R.L. Inhibition of PKA blocks fibroblast migration in response to growth factors. **Exp. Cell. Res.**, v. 270, p. 214-222, 2001.

ENGLARO, W.; BERTOLOTTO, C.; BUSCÀ, R.; BRUNET, A.; PAGÈS, G.; ORTONNE, J.P.; BALLOTTI, R. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway triggers B16 melanoma cell differentiation. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 9966-9970, 1998.

ENGLARO, W.; REZZONICO, R.; CLÉMENT, M.D.; LALLEMAND, D.; ORTONNE, J.P.; BALLOTTI, R. Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in b-16 melanoma cells. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 24315-24320, 1995.

FRANK, S.J.; MEYERS, M. Interferons as adjuvant therapy for high risk melanoma. **Mel. Lett.**, v. 13, p. 1-4, 1995.

FRIZZO, M.E.; SCHWALM, F.D.; FRIZZO, J.K.; SOARES, F.A.; SOUZA, D.O. Guanosine enhances glutamate transport capacity in brain cortical slices. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v. 25, p. 913-921, 2005.

GARBE, C. Cutaneous melanoma: baseline and ongoing laboratory evaluation. **Dermatol. Ther.**, v. 18, p. 413-421, 2005.

GHIORZO, P.; SCARRÀ, G.B. Genetics of melanoma susceptibility. **Forum (Genova)**, v. 13, p. 114-122, 2003.

GOLLOB, J.A.; WILHELM, S.; CARTER, C.; KELLEY, S.L. Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway. **Semin. Oncol.**, v. 33, p. 392-406, 2006.

GYSBERS, J.W.; RATHBONE, M.P. GTP and guanosine synergistically enhance NGF-induced neurite outgrowth from PC12 cells. **Int. J. Devl. Neurosci.**, v. 14, p. 19-34, 1995.

GYSBERS, J.W.; RATHBONE, M.P. Neurite outgrowth in PC12 cells is enhanced by guanosine through both cAMP-dependent and -independent mechanisms. **Neurosci. Lett.**, v. 220, p. 175-178, 1996.

HAASS, N.K.; SMALLEY, K.S.M.; LI, L.; HERLYN, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigm. Cell. Res.**, v. 18, p. 150-159, 2005.

HAASS, N.K.; SMALLEY, K.S.M.; HERLYN, M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. **J. Mol. Histol.**, v. 35, p. 309-318, 2004.

HWU, W.J.; KROWN, S.E.; MENELL, J.H.; PANAGEAS, K.S.; MERREL, J.; LAMB, L.A. Phase II study of temozolomide plus thalidomide for treatment of metastatic melanoma. **J. Clin. Oncol.**, v. 21, p. 3351-3356, 2003.

IIGO, M.; HOSHI, A. Effect of guanosine on antitumor activity of fluorinated pyrimidines against P388 leukemia. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 13(2), p. 86-90, 1984.

IIGO, M.; MIWA, M.; ISHITSUKA, H.; NITTA, K. Potentiation of the chemotherapeutic action of 5'-deoxy-5-fluorouridine in combination with guanosine and related compounds. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 19(1), p. 61-4, 1987.

IIGO, M.; NAKAJIMA, Y.; KURETANI, K.; HOSHI, A. Potentiation of the chemotherapeutic effect of 5-fluoracil by combination with guanosine 5'-monophosphate. **Gann**, v. 74(2), p. 291-8, 1983;

JOHNSON, J.P. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. **Cancer Metastasis Review**, v. 18, p. 345-357, 1999.

JURKOWITZ, M.S.; LITSKY, M.L.; BROWNING, M.J.; HOHL, C.M. Adenosine, inosine, and guanosine protect glial cells during glucose deprivation and mitochondrial inhibition: correlation between protection and ATP preservation. **J. Neurochem.**, v. 71, p. 535-548, 1998.

KELEMEN, B.R.; HSIAO, K.; GOUELI, S.A. Selective in vivo inhibition of mitogen-activated protein kinase activation using cell-permeable peptides. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 8741-8748, 2002.

KIM, S.G.; KIM, C.W.; AHN, E.T.; LEE, K.Y.; HONG, E.K.; YOO, B.I.; HAN, Y.B. Enhanced anti-tumor effects of acriflavine in combination with guanosine in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 49, p. 216-22, 1997.

KIRKWOOD, J.M.; EMSTOFF, M. Role of interferons in the therapy of melanoma. **J. Invest. Dermatol.**, v. 95, p. 180s-184s, 1990.

KONDOH, K.; TORII, S.; NISHIDA, E. Control of MAP kinase signaling to the nucleus. **Chromosoma**, v. 114, p. 86-91, 2005.

LACAL, J.C. Regulation of proliferation and apoptosis by Ras and Rho GTPases through specific phospholipids-dependent signaling. **FEBS Lett.**, v. 410, p. 73-77, 1997.

LAHN, M.M.; SUNDELL, K. The role of protein kinase C- α (PKC- α) in melanoma. **Melanoma Res.**, v. 14, p. 85-89, 2004.

LARA, D.R.; SCHIMIDT, A.P.; FRIZZO, M.E.S.; BURGOS, J.S.; RAMIREZ, G. SOUZA, D.O. Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. **Brain Res.**, v. 912, p. 176-180, 2001.

LAVRIK, I.N.; GOLKS, A.; KRAMMER, P.H. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. **J. Clin. Invest.**, v. 115, p. 2665-72, 2005.

LEE, P.S.; SHIN, D.H.; LEE, K.M.; SONG, S.; YOO, H.S.; MOON, D.C.; HONG, J.T.; CHUNG, Y.B. Effects of guanosine on the pharmacokinetics of acriflavine in rats following the administration of a 1:1 mixture of acriflavine and guanosine, a potential antitumor agent. **Arch. Pharm. Res.**, v. 30(3), p. 372-80, 2007.

LEVERKUS, M.; GOLLNICK, H. "Bak (and Bax) to the future" – of primary melanoma Prognosis? **J. Invest. Dermatol.**, v. 126, p. 1212-1214, 2006.

LITSKY, M.L.; HOHL, C.M.; LUCAS, J.H.; JURKOWITZ, M.S. Inosine and guanosine preserve neuronal and glial cell viability in mouse spinal cord cultures during hypoxia. **Brain Res.**, v. 821, p. 426-432, 1999.

MACKAY, H.J.; TWELVES, C.J. Protein kinase C: a target for anticancer drugs? **Endocrine-Related Cancer**, v. 10, p. 389-396, 2003.

MARSHALL, C.J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. **Cell**, v. 80, p. 179-185, 1995.

MEIER, F.; SATYAMOORTHY, K.; NESBIT, M.; HSU, M.; SCHITTEK, B.; GARBE, C.; HERLYN, M. Molecular events in melanoma development and progression. **Frontiers in Bioscience**, v. 3d, p. 1005-1010, 1998.

MORETTO, M.B.; ARTENI, N.S.; LAVINSCKY, D.; NETTO, C.A.; ROCHA, J.B.T.; SOUZA, D.O.; WOFCHUK, S. Hypoxic-ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats: prevention by guanosine. **Exp. Neurol.**, v. 195, p. 400-406, 2005.

NESBIT, M.; HERLYN, M. Adhesion receptors in human melanoma progression. **Invasion Metastasis**, v. 14, p. 131-146, 1994.

NISHIMOTO, S.; NISHIDA, E. MAPK signaling: ERK5 versus ERK1/2. **European Mol. Biol. Org.**, v. 7, p. 782-786, 2006.

NISHIZUKA, Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. **FASEB J.**, v. 9, p. 484-496, 1995.

OKA, M.; KIKKAWA, U. Protein kinase C in melanoma. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 24, p. 287-300, 2005.

PANKA, D.J.; ATKINS, M.B.; MIER, J.W. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway in the treatment of malignant melanoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 12, p. 2371-2375, 2006.

PARK, H-Y.; RUSSAKOVSKY, V.; AO, Y.; FERNANDEZ, E.; GILCHREST, B.A. α -melanocyte stimulating hormone-induced pigmentation is blocked by depletion of protein kinase C. **Exp. Cell. Res.**, v. 227, p. 70-79, 1996.

PARK, H-Y.; RUSSAKOVSKY, V.; OHNO, S.; GILCHREST, B.A. The β isoform of protein kinase C stimulates human melanogenesis by activating tyrosinase in pigment cells. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 11742-11749, 1993.

PETERSEN, C. Inhibition of cellular growth by increased guanine nucleotide pools. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 5348-5356, 1999.

PLATANIAS, L.C. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. **Blood**, v. 101, p. 4667-4675, 2003.

PRIGNANO, F.; CORONNELLO, M.; PIMPINELLI, N.; CAPPUGI, P.; MINI, E.; GIANNOTTI, B. Immunophenotypical markers, ultrastructure and chemosensitivity profile of metastatic melanoma cells. **Cancer Lett.**, v. 186, p. 183-192, 2002.

PUENTE, L.G.; STONE, J.C.; OSTERGAARD, H.L. Evidence for protein kinase C-dependent and -independent activation of mitogen-activated protein kinase in T cells: potential role of additional diacylglycerol binding proteins. **J. Immunol.**, v. 25, p. 6865-6871, 2000.

QUEIROLO, P.; ACQUATI, M. Biochemotherapy in metastatic melanoma: *quo vadis?* **Melanoma Res.**, v. 15, p. 471-473, 2005.

QUEIROLO, P.; ACQUATI, M.; KIRWOOD, J.M.; EGGRMONT, A.M.M.; ROCCA, A.; TESTORI, A. Update: current management issues in malignant melanoma. **Melanoma Res.**, v. 15, p. 319-324, 2005.

RATHBONE, M.P.; MIDDLEMISS, P.J.; GYSBERS, J.W.; ANDREW, C.; HERMAN, M.A.R.; REED, J.K.; CICCARELLI, R.; DI IORIO, P.; CACIAGLI, F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progress in Neurobiol.**, v. 59, p. 663-690, 1999.

SCHAEFFER, H.J.; WEBER, M.J. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, p. 2435-2444, 1999.

SERRONE, L.; HERSEY, P. The chemoresistance of human malignant melanoma: an update. **Melanoma Res.**, v. 9, p. 51-58, 1999.

SMALLEY, K.; EISEN, T. The involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)-induced melanogenic and anti-proliferative effects in B16 murine melanoma cells. **FEBS**, v. 476, p. 198-202, 2000.

SMALLEY, K.S. A pivotal role for ERK in the oncogenic behavior of malignant melanoma? **Int. J. Cancer**, v. 258, p. 607-614, 1992.

SOENGAS, M. S.; LOWE, S.W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, p. 3138-3151, 2003.

SUYAMA, E.; KAWASAKI, H.; NAKAJIMA, M.; TAIRA, K. Identification of genes involved in cell invasion by using a library of randomized hybrid ribozymes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, p. 5616-5621, 2003.

TRAVERSA, U.; BOMBI, G.; CAMAIONI, E.; MACCHIARULO, A.; CONSTANTINO, G.; PALMIERI, C.; CACIAGLI, F.; PELLICCIARI, R. Rat brain guanosine binding site: biological studies and pseudo-receptor construction. **Bioorganic & Med. Chem.**, v. 11, p. 5417-5425, 2003.

TRAVERSA, U.; BOMBI, G.; DI IORIO, P.; CICCARELLI, R.; WERSTIUK, E.S.; RATHBONE, M.P. Specific [3 H]-guanosine binding sites in rat brain membranes. **British J. of Pharmacol.**, v. 135, p. 969-976, 2002.

TOMASELLI, B.; PODHRASKI, V.; HEFTBERGER, V.; BÖCK, G.; BAIER-BITTERLICH, G. Purine nucleoside-mediated protection of chemical hypoxia-induced neuronal injuries involves p42/44 activation. **Neurochem. Int.**, v. 46, p. 513-521, 2005.

WATTERS, D.J.; PARSONS, P.G. Critical targets of protein kinase C in differentiation of tumour cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 58, p. 383-388, 1999.

ZHANG W.; LIU, H.T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. **Cell. Res.**, v. 12(1), p. 9-18, 2002.

ZHAO, W.; ENTSCHLADEN, F.; LIU, H.; NIGGEMANN, B.; FANG, Q.; ZAENKER, K.S.; HAN, R. Boswellic acid acetate induces differentiation and apoptosis in highly metastatic melanoma and fibrosarcoma cells. **Cancer Detec. Prev.**, v. 27, p. 67-75, 2003.

ANEXOS

Guanosine promotes B16F10 melanoma cell differentiation through PKC-ERK 1/2 pathway

Katya Naliwaiko^{*a,b}, Aline C. Luvizon ^{*a}, Lucélia Donatti^b, Roger Chammas^c, Adriana F. Mercadante^a, Silvio M. Zanata^a, Lia S. Nakao^d

*** these two authors contributed equally to this work**

Departments of ^aBasic Pathology and ^bCell Biology, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil, ^cLaboratório de Oncologia Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ^dCenter for Advanced Molecular Investigation, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

Corresponding author:

Dr. Lia S. Nakao

Tel: + 55-41-3271-2285

Fax: + 55-41-3271-1657

Email address: lia.nakao@pucpr.br

Abstract

Malignant melanoma is one of the most lethal cancers. Nowadays, several antimelanoma therapies have been employed. However, the poor prognosis and/or the increased toxicity of those treatments clearly demonstrate the requirement of searching for new drugs or novel combined chemotherapeutic protocols, contemplating both effectiveness and low toxicity. Guanosine (Guo) has been used in combination with acriflavina to potentiate the latter's antitumor activity, through still unknown mechanisms. Here we show that Guo induces B16F10 melanoma cell differentiation, attested by growth arrest, dendrite-like outgrowth and increased melanogenesis, and also reduced motility. A sustained ERK 1/2 phosphorylation was observed after Guo treatment and ERK inhibition led to blockage of dendritogenesis. Intracellular cyclic AMP was not involved in ERK activation, since its levels remained unchanged. Protein kinase C (PKC), in contrast to phospholipase C (PLC), inhibition completely prevented ERK activation. While the classical melanoma differentiation agent forskolin activates cAMP-PKA-Raf-MEK-ERK pathway in B16F10 cells, here we suggest that a cAMP-independent, PKC-ERK axis is involved in Guo-induced B16F10 differentiation. Altogether, our results show that Guo acts as a differentiating agent, with cytostatic rather than cytotoxic properties, leading to a decreased melanoma malignancy. Thus, we propose that Guo may be envisaged in combination with lower doses of conventional anti-melanoma drugs, in an attempt to prevent or diminish their adverse effects.

Keywords: guanosine, B16F10 differentiation, melanoma, MAP kinase, protein kinase C

Introduction

Metastatic melanoma represents one of the most treatment-resistant of all human malignancies, with a median survival of 6–9 months [1-3]. Several antitumour drugs, such as dacarbazine and interferon- α 2, or combined antimelanoma therapies have been tested in metastatic melanoma [for a review, see 4]; however, the poor prognosis and/or the increased toxicity of those treatments clearly demonstrate the requirement of searching for new drugs or novel combined chemotherapeutic protocols, contemplating both effectiveness and low toxicity [4].

Guanosine (Guo), as well as some Guo-derivatives, have been shown to potentiate the antitumour effects of chemotherapeutic agents, such as acriflavine [5-7], 5'-deoxy-5-fluorouridine [8, 9] by unknown molecular mechanisms. Other biological activities of Guo have been restricted to the nervous system, where it is recognized as a neurotransmitter or neuromodulator. In brain slices, Guo exerts a neuroprotective effect against hypoxic ischemia through enhancing glutamate uptake from the extracellular space [10, 11]. In agreement, neuronal and glial cell viabilities are also preserved by Guo in spinal cord cultures during chemical hypoxia, possibly by acting as an alternative source of energy after further metabolism [12, 13]. Neuroprotection by Guo against hypoxia is partially mediated by p44/42 MAPK activation in PC12 cells [14]. Accordingly, synergistic enhancement of neurite outgrowth promoted by Guo in NGF-stimulated PC12 cells [15] is triggered by both a cAMP-independent and -dependent pathway [16].

In the present study, we investigated whether Guo could induce melanoma cell differentiation and, if so, the molecular mechanisms involved. We demonstrate that Guo increases differentiation parameters in B16F10 cells, such as dendritogenesis and melanogenesis, induces growth arrest and inhibits cell motility. Guo-induced dendritogenesis is dependent on ERK 1/2 phosphorylation. Protein kinase C (PKC) inhibition completely blocks ERK activation, while cAMP is not involved. Our results provide a molecular support

to a therapeutic role of Guo as an enhancer of antitumor drugs activities [5-9], particularly in melanoma treatment.

2. Materials and Methods

2.1 Cell culture

B16F10 melanoma cells were routinely cultivated in RPMI medium containing 10% FCS (Cultilab), gentamycin (40 $\mu\text{g/mL}$) and glutamine (0.3 g/L). Guo stock solution (50 mM) was dissolved in a 0.5 M NaOH solution. Twenty four hours before treatment with Guo, culture medium was changed to RPMI medium containing 0.1% FCS. Treatments were made in medium with 0.1% FCS. Control experiments (vehicle) were performed by addition of 0.5 M NaOH in equal volumes of those added for the maximum Guo concentration used.

2.2 Proliferation assay

2×10^5 cells were seeded in 6-well plates and treated with Guo during 24 and 48h. Cells were detached and collected in 500 μL RPMI medium. Cells were counted by a flow cytometer (BD Facsclibur) during one minute at a flow of 60 $\mu\text{L/min}$. Data was analyzed by CellQuest software (BD Facsclibur). Cell viability was determined employing Trypan Blue dye exclusion assay after 24 and 48h of Guo treatment. To investigate apoptosis, 5×10^5 cells were treated with Guo or vehicle during 24h and 48h. They were collected in PBS, in a final volume of 500 μL , incubated with annexin V-FITC and propidium iodide, as recommended (Apoptosis Detection kit, BD Biosciences) and analyzed by flow cytometry. In each experimental condition, 3×10^4 events were analyzed. Data shown are mean \pm SEM of three independent experiments.

2.3 Morphological analysis

5×10^4 cells were plated in 35 mm dishes and treated with Guo during 48h. After treatment, cells were fixed with 3% paraformaldehyde, stained with Violet Crystal (0.25% in

methanol, 10 min) and analyzed under a light microscopy. Results were expressed as the percentage of cells with cytoplasmic extension longer than three cellular bodies in relation the total number of cells. In some experiments, cells were treated with 10 μ M cell permeable peptide 1, an ERK 1/2 inhibitor [17], 30 min before and during the 24h-incubation with Guo.

2.4 Melanin determination

B16F10 melanoma cells were plated in 60 mm dishes and treated with 1 mM Guo during 48h. Then 10⁵ cells were pelleted and were dissolved in 1mL of 1 M NaOH/ 10% DMSO, followed by incubation at 80 °C for 2 h. Resulting suspensions were centrifuged (12,000 x g for 10 min, RT) and supernatant absorbances were measured at 470 nm. Melanin content was expressed as absorbance per 10⁵ cells.

2.5 Ultrastructure analysis

Melanin production was determined by counting cells containing visible melanosomes in electronic transmission microscopy assays, as described [18]. Cells treated with Guo during 24 and 48 h were washed with PBS, trypsinized and then fixed in Karnowski solution (2% formaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 mM cacodylate buffer, pH 7.4) overnight at 4°C. Cells were then osmicated and embedded in Epon-812. Ultrathin sections were stained with 2% uranyl acetate (Merck) followed by lead 2% nitrate/acetate [19]. Sections were observed in a Jeol 1200 EX II electron microscope. Twenty microscopic fields were analyzed and at least 150 cells were counted (total number of cells). Cells presenting more than 5 highly pigmented melanosomes were considered.

2.6 Migration assays

The wound migration assay was performed according to Suyama et al [20]. Briefly, 10⁶ cells were plated in 6-well plates previously coated with 10 μ g/ml fibronectin. After 4 hours, a p-200 pipette tip scraped the dish surface to generate a “wound”. Plates were gently rinsed with PBS and cells were treated with 1mM Guo or vehicle. Cells were photographed after 12,

24, 36 and 48h and the number of migrating cells in an arbitrary area was determined. Cell migration was also assessed using a Boyden chamber. B16F10 were routinely treated with 1 mM of Guo or vehicle during 24 h. Then, 1.8×10^5 cells were plated in a Boyden chamber and maintained at 37°C and 5% CO₂ during 3h, using RPMI 1640 with 10% FCS as chemottractant. Cells were fixed in 100% methanol, stained with violet crystal, photographed and counted.

2.7 Western blotting

7.5×10^6 cells seeded in 35 mm plates were treated with 1 mM Guo or vehicle for 5, 15, 30, 60 or 120 minutes. Cells were lysed (20 mM Hepes buffer pH 7.4, containing 15 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10% glycerol, 1% triton X-100, with protease and phosphatase inhibitors, Sigma) for 15 minutes, 4°C. After centrifugation (10.000g, 10 min), supernatants were collected and the protein contents were determined. Proteins were separated on 10% SDS-PAGE and electroblotted onto a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with 5% skim milk, followed by overnight incubation with the primary antibody anti-pERK 1/2 (1:500, Cell Signaling), and then incubated with secondary antibody conjugated with HRP (1:2000, GE). Reaction was developed with WestPico chemiluminescence kit (Pierce) and detected in autoradiography films. Protein load control was done with anti-total ERK 1/2 (1:500), in the same membranes after antibody stripping. Band densitometry was performed with ImageJ software. In some experiments, cells were incubated with protein kinase C (3 μ M) or phospholipase C (5 μ M) inhibitors (BIM-I and U73122 respectively, Calbiochem) 30 min before and during treatment with 1mM Guo or vehicle. U73343 was used as negative control of PLC inhibitor. Cells were treated for 30 min with Guo and ERK 1/2 activation assay was performed as described above.

2.8 Intracellular cAMP measurement

Cyclic AMP levels were determined in cells treated with Guo during 2, 10, 30 and 60 min with the cAMP kit (GE), according to the manufacture's recommendations. Forskolin (10 μ M, 10 min) was used as positive control.

2.9 Statistical analysis

Data are presented as mean \pm S.E.M. of at least three independent experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's test was used for proliferation and ERK inhibition assays. For the other experiments statistical analysis was done using single-mean Student's t test. In all analysis, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

Since B16F10 grows at a high rate and can be cultivated in low serum medium, we maintained cells at a moderate proliferation rate with RPMI containing 0.1% FCS 24h before and during treatments. Otherwise, high cell confluence would preclude the examination of the long term effects (48h) of Guo.

3.1 Guo induces B16F10 growth arrest and differentiation

Treatment of B16F10 melanoma cells with increasing concentrations of Guo (0.25, 0.5, 1 and 2 mM) induced growth arrest compared to control (Fig. 1A). After 24 hours, all tested Guo concentrations inhibited cell proliferation in a dose-dependent fashion. Cell growth inhibition was significantly increased in cells treated with 0.5, 1 and 2 mM Guo during 48h. Trypan Blue exclusion assay demonstrated cell viabilities >95% in all tested conditions and microscopic examination did not show cell debris (data not show). These data were suggestive that the decreased cell counting observed for Guo-treated cells, compared to control cells, was not associated with cell death. Dye exclusion assays, however, do not detect initial stages of apoptotic death, which might underestimate a cytotoxic effect of Guo. Thus, binding of 1mM Guo-treated cells to annexin V was analyzed by flow cytometry, after 24h- and 48h-treatment (Table 1). Results demonstrated that phosphatidylserine exposure

and propidium iodide incorporation were similar in all conditions, confirming that Guo was not increasing apoptotic rates.

In addition, remarkable dendrite-like processes were observed in cells cultured in the presence of Guo, especially after 48 h (Fig. 1B), suggesting melanoma differentiation [21-23]. This dendricity was, however, different from that induced by 10 μ M forskolin (data not shown), a known melanoma differentiating agent [22, 23]. While Guo induced a fusiform shape associated with an outstanding paralleled cell arrangement (Fig. 1B), forskolin induced arborescent dendrites, similar to neuronal cells dendrites [24]. The number of such elongated cells was significantly increased *ca.* 2-fold in Guo-treated cells (Fig. 1B). B16F10 melanoma differentiation is determined by increased dendritogenesis and melanogenesis [21-23]. Thus, melanin content was determined. Indeed, after 24 and 48h, Guo treatment promoted darkening of the cell pellets compared to the untreated cells (data not shown). Using the classical colorimetric method, we found that Guo increased melanin concentration after 48h (0.009 ± 0.003 vs 0.018 ± 0.004 $A_{470nm}/10^5$ cells), although this difference was not statistically significant, probably due to the low sensitivity method. Therefore, melanogenesis induced by Guo was quantified by counting cells presenting at least 5 highly pigmented melanosomes in electronic transmission microscopy (ETM). The results demonstrated that Guo induced melanogenesis, as early as at 24h (Fig. 1C).

3.2 *Guo decreases B16F10 motility*

To determine if Guo was rescuing the differentiated state of B16F10 cells and consequently leading to a less malignant feature, a wound migration experiment was performed. Cells treated with 1 mM Guo presented a decreased motility when compared to untreated cells. After 12h-treatment, the number of migrating Guo-treated cells was lower than 50% compared to control (Fig. 2A). Although this effect could be due to growth arrest induced by Guo, the differences between control and Guo-treated cells in the proliferation rate (Fig. 1A) do not account for the differences in the number of migrating cells (Fig. 2A). For instance, at 24h, migration inhibition (*ca.* 70%) was higher than proliferation inhibition

(ca. 55%, Fig.1A), suggesting that at 24h, these two processes are not completely associated. At longer times, Guo-treated cells showed even lower migration ability than control cells (Fig. 2A). To exclude the contribution of the anti-proliferative effect of Guo in migration inhibition, we performed a migration assay in a Boyden chamber. After 24h treatment, cells were plated in the Boyden chamber and 3h later the number of migrating cells was counted. Under this condition, cell growth arrest effects cannot interfere in cell migration. Results obtained showed that the number of migrating cells pre-treated with 1 mM Guo during 24h was approximately 4 times lower than that of the control cells (Fig. 2B).

3.3 *ERK 1/2 activation contributes to Guo-induced B16F10 differentiation*

Western blotting assays were performed to analyze whether ERK1/2 was involved in the cellular phenotypic modulation elicited by Guo. A significant increase in ERK1/2 phosphorylation was observed in B16F10 cells treated for 15 and 30 min with 1 mM Guo, an effect sustained until 120 min-treatment (Fig. 3 A). In line with this observation, sustained ERK 1/2 activation has been described during differentiation of different cell types [25-27].

The participation of ERK 1/2 in Guo-induced B16F10 differentiation was confirmed with a specific ERK inhibitor, cell permeable peptide 1 [17]. Dendrite extension was chosen to address this question (Fig. 3 B). As previously described (see above and Fig. 1B) 1mM Guo triggered B16F10 dendritogenesis after 24h, a process that could be prevented if cells were treated with 10 μ M ERK 1/2 inhibitor before and during Guo exposure. Dimethylsulfoxide, the inhibitor solvent, did not interfere in the assay (Fig. 3B). Moreover, the increased melanin synthesis was also inhibited after 24h in the presence of the inhibitor (data not shown), demonstrating that B16F10 differentiation induced by Guo is dependent on ERK 1/2 phosphorylation.

To further analyze the upstream ERK 1/2 pathway, we measured the intracellular levels of cAMP, which has been shown to induce melanoma differentiation through early MAPK ERK 1/2 activation [22]. Guo, however, did not elicit cAMP synthesis in B16F10, in contrast to forskolin (data not shown), a known cAMP-elevating agent. Then, given that increased

melanogenesis has been shown to be induced also by PKC activation [28, 29], the role of this kinase in ERK phosphorylation was tested. Our data demonstrated that PKC inhibitor bisindolyl maleimide-I (BIM-I) completely prevented ERK 1/2 activation, while phospholipase C inhibitor U73122 failed to decrease ERK activation (Fig. 3C). Thus, PKC-ERK axis is involved in the differentiation signal promoted by Guo, in a PLC-independent way.

4. Discussion

The results presented here demonstrated that Guo promotes specific effects on B16F10 cells, such as growth arrest, paralleled cell arrangement, cytoplasmic extensions and melanogenesis. These features are indicative of melanoma differentiation [22-24, 29, 30], since cell differentiation is generally accepted to be accompanied by reduced proliferation, and melanocytes deliver melanin to keratinocytes through long dendritic processes [23, 31, 32]. Several agents have been shown to promote melanoma differentiation, measured either by melanin content and/or dendricity [23-24, 32]. Recently, B16F10 differentiation was described to be also induced by the plant metabolite boswellic acid acetate [21]. Interestingly, the morphological alteration induced by Guo and boswellic acid acetate was similar, and differed from that induced by forskolin (and other cAMP elevating agents), likely due to dissimilar sets of orchestrating proteins expression/activation. Thus, different cascades of molecular events can culminate in melanoma melanogenesis and dendritogenesis.

It is known that both *in vivo* [33] as well as in melanocytes and melanoma cells [22, 31, 34], ultraviolet radiation and α -MSH triggers melanogenesis through G protein-coupled receptor, activating adenylate cyclase. Pharmacological agents that elevate the intracellular cAMP levels, such as forskolin, cholera toxin or isobutylmethylxanthine also induce melanin synthesis [22, 31, 34], demonstrating the importance of cAMP to this process. In B16F10, it is reported that cAMP signal is transduced to the nucleus through ERK 1/2 activation [22].

Our data, however, showed that Guo induces a sustained ERK 1/2 activation without elevating cAMP levels. Interestingly, growth arrest, neurite outgrowth and ERK activation have also been described for cAMP-induced differentiation of pheochromocytoma PC12 cells [35]. In these cells Guo is also able to enhance neurite outgrowth, through both cAMP-dependent and independent mechanisms [16]. Thus, due to common neural crest origin between PC12 and B16F10 cells, the cAMP-independent differentiation could also take place in melanoma cells. The participation of PKC in melanoma differentiation induced by α -MSH [28, 29] demonstrates that cAMP pathway does not seem to be the sole determinant in the differentiation program. Indeed, our result showed that PKC inhibition prevented ERK activation, probably precluding differentiation. Collectively, these data suggest that melanogenesis and dendritogenesis are modulated by two major pathways: cAMP-dependent and PKC-dependent ERK phosphorylation, which can cross-talk according to the stimulating agent. Based on our results and those from literature [22, 28, 29, 36], we propose that the cAMP-dependent mechanism, triggered by forskolin for instance, activates the classical PKA > Ras > Raf > MEK and ERK pathway. Guo activates only the PKC-ERK pathway, while α -MSH is able to activate both [22, 28, 29, 37]. In this model, cAMP/PKA and PKC cross-talk through a unidirectional flow, from PKA to PKC, since depletion of PKC does not alter either cAMP levels or PKA activity, but completely blocks pigmentation [29]. Englaro et al. reported that MEK inhibition by PD 98059 intriguingly increases melanoma dendricity [24]. Although well known and widely used, this inhibitor is different from peptide 1 used here, which specifically inhibits ERK activation. This means that either there is an ERK-independent pathway for melanoma differentiation, or that result can be rationalized as a consequence of PKC-ERK activation, where PKC activates ERK directly, without MEK action. PKC, however, has only been reported to activate ERK 1/2 upstream Ras or Raf-1 [38]. PKC comprises a family of at least ten isoforms, initially identified as a signaling molecule involved in carcinogenesis of skin tumors [revised in 39, 40]. Regarding B16 murine melanoma cell lines, most well documented isoforms are PKC- α , followed by PKC- δ and

PKC- β [39]. Several groups have demonstrated that increased PKC- α expression/activation has been associated with increased melanoma proliferation and decreased differentiation [40]. However, it is generally accepted that the α , as well as the β isoform, induces both melanogenesis [39, 41, 42] and growth arrest [39, 42, 43]. Paradoxically, these isoforms have been postulated to increase melanoma migration and metastasis [39, 40]. PKC- δ , on the other hand, seems to suppress tumor invasiveness and growth [39]. Since BIM-I inhibits PKC- α , - β , - δ , among others, we cannot ascertain which enzyme(s) is(are) involved in Guo-induced ERK activation.

Interestingly, PLC is not involved in Guo signaling. This nucleoside presents protective effects in several nervous cells, such as hippocampal [11], PC12 [14] and glial [13] cells during hypoxic injury. Recently, a G-coupled receptor for Guo has been described in rat brain [44]. However, due to the lack of action of PLC and cAMP, a G-coupled protein receptor is probably not involved in the Guo-induced signaling.

Finally, Guo inhibited cell motility, which corroborates the decreased malignancy as a consequence of melanoma differentiation. In this context, Guo emerges as a melanoma differentiating agent, with cytostatic rather than cytotoxic properties. This effect could discourage the idea of employing Guo as a chemotherapeutic agent, since the rationale strategy to fight melanoma is activation of the apoptotic program [45]. Nonetheless, its low toxicity coupled to its antiproliferative and differentiative effects in B16F10 cells, leading to a decreased malignancy, may be envisaged in combination with lower doses of conventional chemotherapeutic drugs, in an attempt to prevent or diminish their adverse effects. This hypothesis is currently being tested in experimental animals.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação Araucária, CNPq and FINEP. Fellowships from CAPES (A.C.L.) and CNPq (K.N. and S.M.Z) are acknowledged. We thank Dr. Vilma

Martins and Dr. Luciana Chiarini for the inhibitors donation and Dr. Luiz C. Fernandes for critical reading of this manuscript.

References

- [1] L. Chin, A.I. Garraway, D.E. Fisher. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era, *Genes Dev* 20 (2006) 2149-2182.
- [2] F. Prignano, M. Coronello, N. Pimpinelli, P. Cappugi, E. Mini, B. Giannotti. Immunophenotypical markers, ultrastructure and chemosensitivity profile of metastatic melanoma cells, *Cancer Lett.* 186 (2002) 183-192.
- [3] L. Serrone, P. Hersey. The chemoresistence of human malignant melanoma: an update, *Melanoma Res* 9 (1999) 51-58.
- [4] P. Queirolo, M. Acquati, J.M. Kirkwood, A.M.M. Eggermont, A. Rocca, A. Testori. Update: current management issues in malignant melanoma, *Melanoma Res.* 15 (2005) 319-324.
- [5] S.G. Kim, C.W. Kim, E.T Ahn, K.Y. Lee, E.K. Hong, B.I. Yoo, et al. Enhanced anti-tumour effects of acriflavine in combination with guanosine in mice, *J. Pharm. Pharmacol.* 49 (1997) 216-222.
- [6] P.S. Lee, D.H. Shin, K.M. Lee, S. Song, H.S. Yoo, D.C. Moon, J.T. Hong, Y.B. Chung. Effects of guanosine on the pharmacokinetics of acriflavine and guanosine, a potential antitumor agent, *Arch. Pharm. Res.* 30 (2007) 372-380.
- [7] S. Song, O.S. Kwon, Y.B. Chung. Pharmacokinetics and metabolism of acriflavine in rats following intravenous or intramuscular administration of AG60, a mixture of acriflavine and guanosine, a potential antitumour agent, *Xenobiotica* 35 (2005) 755-773.
- [8] M. Iigo, M. Miwa, H. Ishitsuka, K. Nitta. Potentiation of the chemotherapeutic action of 5'-deoxy 5-fluorouridine in combination with guanosine and related compounds, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 19 (1987) 61-64.
- [9] M. Iigo, A. Hoshi. Effect of guanosine on antitumor activity of fluorinated pyrimidines against P388 leukemia, *Cancer Chemother Pharmacol.* 13 (1984) 86-89.

- [10] M.E. Frizzo, F.D. Schwalm, J.K. Frizzo, F.A. Soares, D.O. Souza. Guanosine enhances glutamate transport capacity in brain cortical slices, *Cell. Mol. Neurobiol* 25 (2005) 913-921.
- [11] M.B. Moretto, N.S. Arteni, D. Lavinsky, C.A. Netto, J.B.T. Rocha, D.O. Souza, et al. Hypoxic-ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats: prevention by guanosine, *Exp. Neurol* 195 (2005) 400-406.
- [12] M.S. Jurkowitz, M.L. Litsky, M.J. Browning, C.M. Hohl. Adenosine, inosine, and guanosine protect glial cells during glucose deprivation and mitochondrial inhibition: correlation between protection and ATP preservation, *J. Neurochem.* 71 (1998) 535-548.
- [13] M.L. Litsky, C.M. Hohl, J.H. Lucas, M.S. Jurkowitz. Inosine and guanosine preserve neuronal and glial cell viability in mouse spinal cord cultures during hypoxia, *Brain Res.* 821 (1999) 426-432.
- [14] B. Tomaselli, V. Podhraski, V. Heftberger, G. Böck, G. Baier-Bitterlich. Purine nucleoside-mediated protection of chemical hypoxia-induced neuronal injuries involves p42/44 activation, *Neurochem. Int.* 46 (2005) 513-521.
- [15] J.W. Gysbers, M.P. Rathbone. GTP and guanosine synergistically enhance NGF-induced neurite outgrowth from PC12 cells, *Int. J. Devl. Neurosci.* 14 (1996) 19-34.
- [16] J.W. Gysbers, M.P. Rathbone. Neurite outgrowth in PC12 cells is enhanced by guanosine through both cAMP-dependent and –independent mechanisms, *Neurosci. Lett.* 220 (1996) 175-178.
- [17] B.R. Kelemen, K. Hsiao, S.A. Goueli. Selective in vivo inhibition of mitogen-activated protein kinase activation using cell-permeable peptides, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 8741-8748.
- [18] M.N. Luciano, P.H. da Silva, O.M. Chaim, V.L. dos Santos, C.R. Franco, M.F. Soares, et al. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom in renal tissue, *J. Histochem. Cytochem.* 52 (2004) 455-467.
- [19] E.S. Reynolds. The use of lead citrate at high pH as an electron – opaque stain in electron microscopy, *J. Cell Biol.* 17 (1963) 208–212.

- [20] E. Suyama, H. Kawasaki, M. Nakajima, K. Taira. Identification of genes involved in cell invasion by using a library of randomized hybrid ribozymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 5616-5621.
- [21] W. Zhao, F. Entschladen, H. Liu, B. Niggemann, Q. Fang, K.S. Zaenker, et al. Boswellic acid acetate induces differentiation and apoptosis in highly metastatic melanoma and fibrosarcoma cells, *Cancer Detect. Prev.* 27 (2003) 67-75.
- [22] W. Englaro, R. Rezzonico, M. Durand Clément, D. Lallemand, J.P. Ortonne, R. Ballotti. Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 24315-24320
- [23] G. Scott, S. Leopardi. The cAMP signaling pathway has opposing effects on RAC and Rho in B16F10 cells: implications for dendrite formation in melanocytic cells, *Pigment Cell Res.* 16 (2003) 139-148.
- [24] W. Englaro, C. Bertolotto, R. Buscà, A. Brunet, G. Pagès, J.P. Ortonne, R. Ballotti. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway triggers B16 melanoma cell differentiation, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 9966-9970.
- [25] N. Bhagavathula, E.A. Kelley, M. Reddy, K.C. Nerusu, C. Leonard, K. Fay, et al. Upregulation of calcium-sensing receptor and mitogen-activated protein kinase signalling in the regulation of growth and differentiation in colon carcinoma, *Br. J. Cancer* 93 (2005) 1364-1371.
- [26] H.S. Kim, S. Yumkham, S.H. Kim, K. Yea, Y.C. Shin, S.H. Ryu, et al. Secretin induces neurite outgrowth of PC12 through cAMP-mitogen-activated protein kinase pathway, *Exp. Mol. Med.* 38 (2006) 85-93.
- [27] F.K. Racke, K. Lewandowska, S. Goueli, A.N. Goldfarb. Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway is required for megakaryocytic differentiation of K562 cells, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 23366-23370.
- [28] J. Buffey, A.J. Thody, S.S. Bleehen, S. Mac Neil. Alpha-melanocyte-stimulating hormone stimulates protein kinase C activity in murine B16 melanoma, *J. Endocrinol.* 133 (1992) 333-340.

- [29] H.Y. Park, V. Russakovski, Y. Ao, E. Fernandez, B.A. Gilchrest. Alpha-melanocyte stimulating hormone-induced pigmentation is blocked by depletion of protein kinase C, *Exp. Cell. Res.* 227 (1996) 70-79.
- [30] J.R. Gruber, S. Ohno, R.M. Niles. Increased expression of protein kinase C α plays a key role in retinoic acid-induced melanoma differentiation, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 13356-13360.
- [31] G. Wong, J. Pawelek, M. Sansone, J. Morowitz. Response of mouse melanoma cells to melanocyte stimulating hormone, *Nature* 248 (1974) 351-354.
- [32] C. Garbe, K. Krasagakis, C.C. Zouboulis, K. Schroder, S. Kruger, R. Stadler, et al. Antitumor activities of interferon alpha, beta, and gamma and their combinations on human melanoma cells in vitro: changes of proliferation, melanin synthesis, and immunophenotype, *J. Invest. Dermatol.* 95 (suppl) (1990) S231-237.
- [33] N. Levine, S.N. Sheftel, T. Eytan, R.T. Dorr, M.E. Hadley, J.C. Weinrach, et al. Induction of skin tanning by subcutaneous administration of a potent synthetic melanotropin, *JAMA* 266 (1991) 2730-2736.
- [34] R. Buscà, C. Bertolotto, J.P. Ortonne, R. Ballotti. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/p70S6-kinase pathway induces B16 melanoma cell differentiation, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 31824-31830.
- [35] S. Cowley, H. Peterson, P. Kemp, C.J. Marshall. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells, *Cell* 77 (1994) 841-852.
- [36] D.J. Watters, P.G. Parsons. Critical targets of protein kinase C in differentiation of tumor cells, *Biochem. Pharmacol.* 58 (1999) 383-388.
- [37] Y. Ao, H.Y. Park, S. Olaizola-Horn, B.A. Gilchrest. Activation of cAMP-dependent protein kinase is required for optimal alpha-melanocyte-stimulating hormone-induced pigmentation, *Exp. Cell. Res.* 244 (1998) 117-124.

- [38] L.G. Puente, J.C. Stone, H.L. Ostergaard. Evidence for protein kinase C-dependent and independent activation of Mitogen-Activated protein kinase in T cells: potential role of additional diacylglycerol binding proteins, *J. Immunol.* 165 (2000) 6865-6871.
- [39] M. Oka, U. Kikkawa. Protein kinase C in melanoma, *Cancer Metastasis Rev.* 24 (2005) 287-300.
- [40] M. Lahn, K.L. Sundell. The role of protein kinase C- α (PKC- α) in melanoma, *Melanoma Res.* 14 (2004) 85-89.
- [41] S.E. Rosenbaum, R.M. Niles. Regulation of protein kinase C gene expression by retinoic acid in B16 mouse melanoma cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 294 (1992) 123-129.
- [42] X. Zhao, T. Murata, S. Ohno, N. Day, J. Song, N. Nomura, T. Nakahara, K.K. Yokoyama. Protein kinase C α plays a critical role in mannosylerythritol lipid-induced differentiation of melanoma B16 cells, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 39903-39910.
- [43] K. Krasagakis, C. Lindschau, S. Fimmel, J. Eberle, P. Quass, H. Haller, C.E. Orfanos. Proliferation of human melanoma cells is under tight control of protein kinase C α , *J. Cell. Physiol.* 199 (2004) 381-387.
- [44] U. Traversa, G. Bombi, E. Camaioni, A. Macchiarulo, G. Constantino, C. Palmieri, et al. Rat brain guanosine binding site: biological studies and pseudo-receptor construction, *Bioinorg. Med. Chem.* 11 (2003) 5417-5425.
- [45] M. Leverkus, H. Gollnick. "Bak (and Bax) to the future" – of primary melanoma prognosis?, *J. Invest. Dermatol.* 126 (2006) 1212-1214.

Figure legends

Figure 1. Guo induces cell growth arrest and differentiation. (A) Serum-deprived B16F10 cells were treated with different concentrations of Guo or with vehicle (NaOH solution) during 24 or 48 h, after which cells were counted by a flow cytometer. * $p < 0.05$, One-way ANOVA, Tukey *post hoc* test vs vehicle. **(B)** Serum-deprived cells were treated with 1 mM Guo or vehicle during 48h, and stained with violet crystal. In each experiment at least 250 cells were counted (total number of cells), among which cells with cytoplasmic extensions longer than 3 cellular bodies were quantified. * $p < 0.05$, Student's *t* test vs vehicle. Magnification 100 X. **(C)** Representative electromicrography of melanoma cells treated with 1mM Guo or vehicle during 24h, showing an increase in cells containing highly pigmented melanosomes (arrows). Data represents mean \pm S.D. in three experiments * $p < 0.05$ Student's *t* test vs vehicle. Magnification 8000 X

Figure 2. Guo inhibits cellular motility. (A) Cells (10^6 cells/well) were plated in six-well plates previously coated with 10 $\mu\text{g/ml}$ fibronectin. After 4 hours, a 0.2 ml pipette tip scratched a line on adherent cells surface. After washing, cells were treated with 1mM Guo or vehicle. After the indicated periods, the number of migrating cells into the scratched region was determined. **(B)** Cells (1.8×10^5) pre-treated with 1 mM Guo or with vehicle were plated in Boyden chambers. After 3h, the number of migrating cells was counted after staining with violet crystal. * $p < 0.05$, Student's *t* test vs vehicle

Figure 3. ERK 1/2 activation in Guo-induced B16F10 differentiation. (A) Representative Western blotting of phosphorylated and total ERK 1/2 in protein extracts of B16F10 treated with 1mM Guo (G) or vehicle (V) during the indicated periods. After bands densitometry, the ratio of phosphorylated per total ERK1/2 in

Guo-treated cells were compared to those of control cells (100%). **(B)** Long-term ERK 1/2 inhibition by the specific inhibitor peptide 1 (10 μ M) blocked the effects of Guo on dendritogenesis in cells treated for 24h. Cells were stained and those with dendrite-like structures were counted * p < 0.05, One-way ANOVA, Tukey *post hoc* test vs vehicle. **(C)** Representative Western blotting of phosphorylated and total ERK 1/2 in protein extracts of B16F10 treated with 1mM Guo or vehicle during 30 min. PLC inhibitor U73122 and PKC inhibitor BIM-I were incubated 30 min before and during Guo treatment.

Figure 1

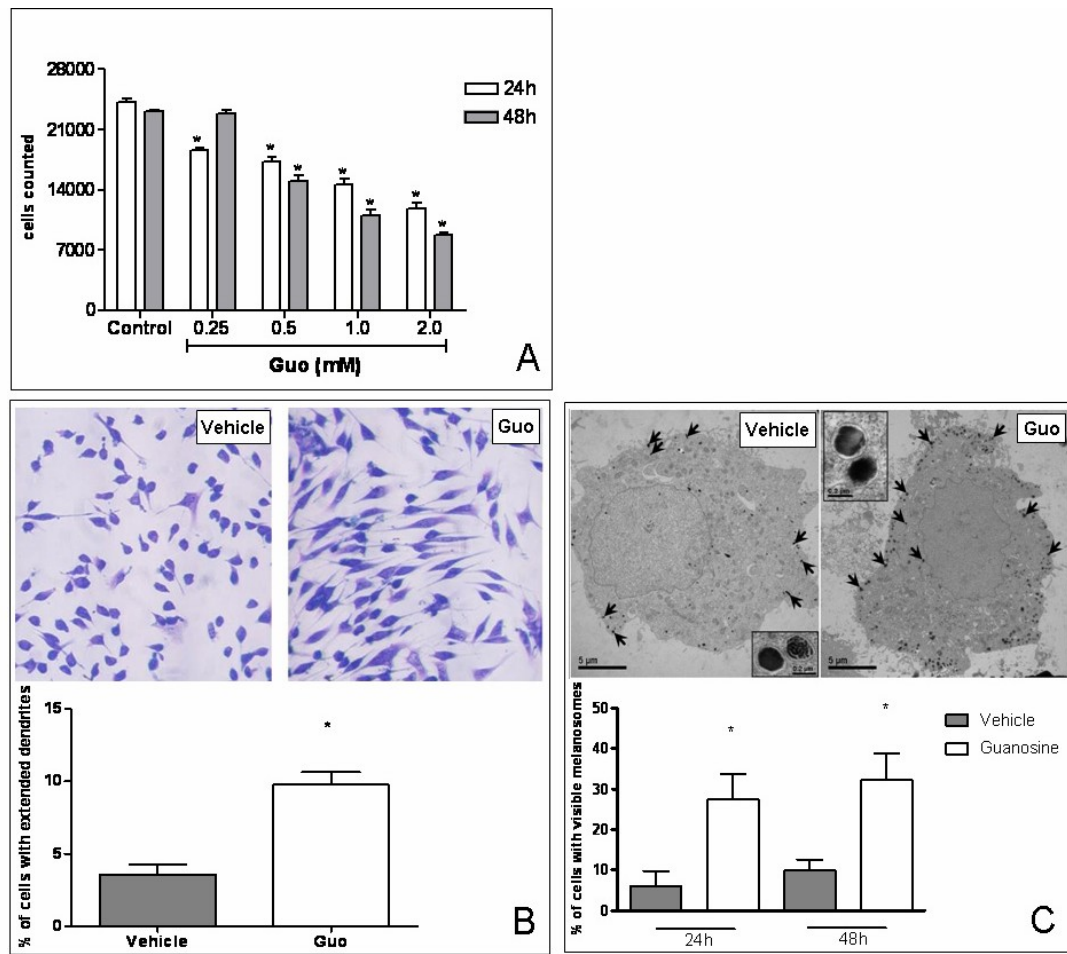


Figure 2

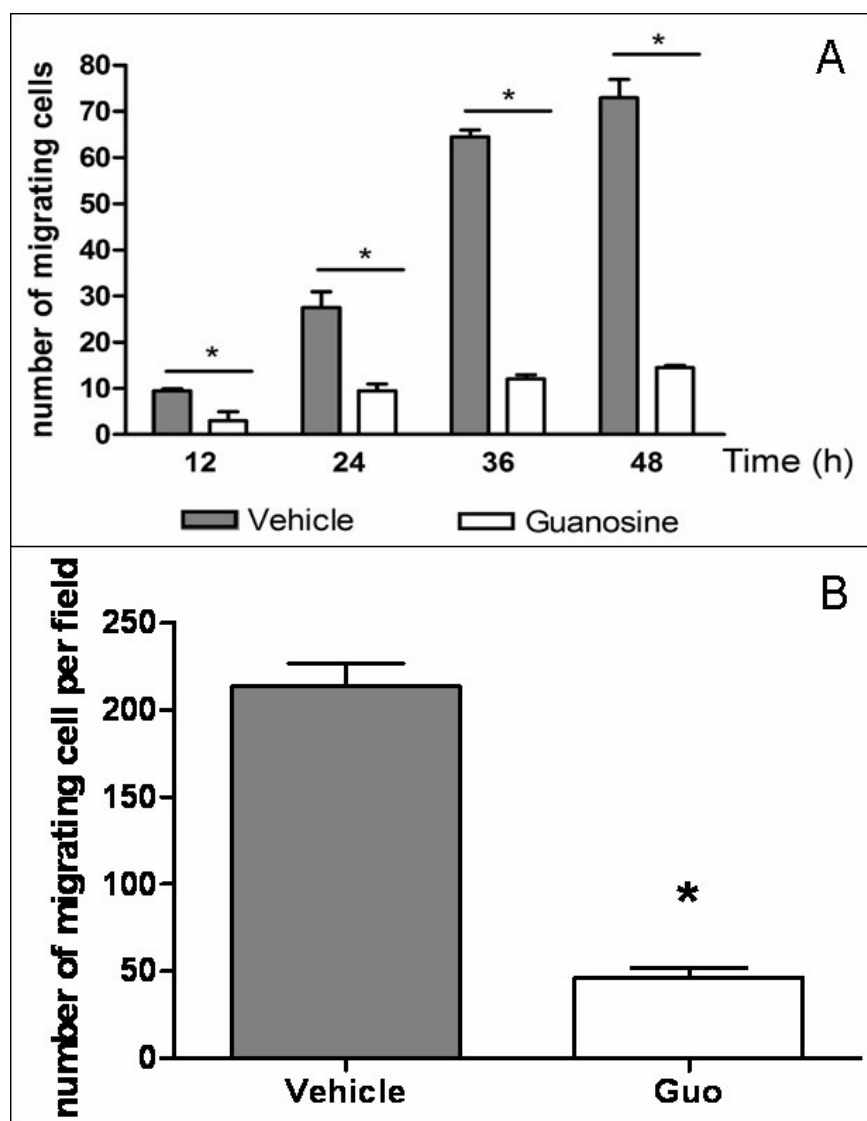
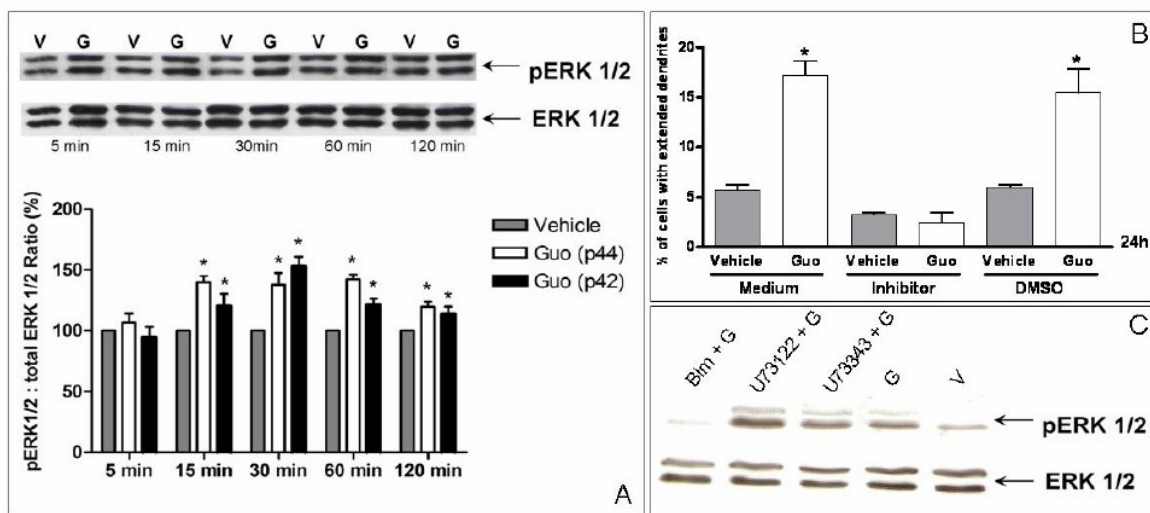


Figure 3



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.